

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Κυκλοφορία ενός σπάνιου διαγενοτυπικού ανασυνδυασμένου Νοροϊού GII.9/GII.6
στην κεντρική Ελλάδα

Circulation of a rare intergenotype recombinant norovirus GII.9/GII.6 in central
Greece

Επιμέλεια:

Παπαμιχαήλ Χριστίνα

Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων διδάσκων

Μαρκουλάτος Παναγιώτης

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία

Μέλη

Αμούτζιας Γρηγόριος

Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική

Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα

Ειδικό Ερευνητικό και Διδακτικό Προσωπικό ΕΕΔΙΠ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πραγματοποίηση του συγκεκριμένου πειράματος και η συγγραφή της παρούσας πτυχιακής εργασίας θα αποτελούσε πολύ δύσκολο έργο χωρίς την απαραίτητη συνδρομή και συμπαράσταση ορισμένων ατόμων.

Για τον λόγο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κύριο Παναγιώτη Μαρκουλάτο για την επίβλεψη της διπλωματικής μου εργασίας, την επιστημονική του γνώση και το προσωπικό ενδιαφέρον που τόσο απλόχερα μου παρείχε καθώς επίσης και για τα ερεθίσματα που μου έδωσε και με οδήγησε να αγαπήσω τον «κόσμο» της ιολογίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Γρηγόριο Αμούτζια για τη συμμετοχή του στην αξιολόγηση της παρούσας εργασίας και για την προθυμία του να παρέχει τις γνώσεις του τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο.

Ακόμα την Ειρήνη Ρούτερ, την Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου, τον Τηλέμαχο Δημητρίου και τον Δημήτρη Τσακογιάννη οι οποίοι πρόσφεραν με ευγένεια τη γνώση τους σχετικά με την ιολογία. Επίσης για την απαραίτητη και τόσο σημαντική προσφορά τους καθ' όλη τη διεξαγωγή του πειράματος αλλά και τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχαν αλλά και για την προθυμία τους να με καθοδηγήσουν σε οποιοδήποτε επίπεδο.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την συμβολή της κατά την διάρκεια των σπουδών μου και την συνεχή ενθάρρυνση και συμπαράσταση τους σε όλους τους τομείς και που χωρίς τη δική τους αγάπη δε θα κατάφερνα να συνεχίζω να σπουδάζω το αντικείμενο που αγαπήσα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Abstract	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Εισαγωγικά Στοιχεία	9
1.2 Βιολογία των Νοροϊών	12
1.3 Παθογένεια	21
1.4 Επιδημιολογία	21
1.5 Διαγνωστικές μέθοδοι	23
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1 Πειραματικά στελέχη	27
2.2 Επεξεργασία δειγμάτων	27
2.3 Εκχύλιση του ιικού RNA	28
2.4 Αντίστροφη Μεταγραφή (ReverseTranscription – RT)	28
2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	29
2.6 Κλωνοποίηση	31
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	39
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48

Abstract

Noroviruses (NoVs) are members of the Caliciviridae family and are recognized as a worldwide cause of acute nonbacterial gastroenteritis. Based on the genetic analysis of the RdRp and capsid regions, human NoVs are divided into three genogroups (Gs), GI, GII, and GIV, which further segregate into distinct lineages called genotypes. In this study, in an attempt to discern the circulation of an intergenotypic recombinant GII.9/GII.6, which was previously reported by our group in central Greece, we investigated NoVs in raw sewages from 2006 to 2011 and compared the results with the viruses detected from clinical samples in the same area and in the same time period. Two specific primer pairs for NoVs were designed which amplified in a single PCR fragment from polymerase to capsid gene covering the widespread recombination point in ORF1/ORF2 junction. Based on the genetic analysis, recombinant NoV strains GII.9/GII.6 were identified. Fourteen out of 15 environmental and eight out of ten clinical samples that were used in the present study were positive, with both primer pairs, confirming that the inter- genotypic recombinant GII.9/GII.6 was circulating in the population of central Greece from 2006 to 2011. The crossover point was identified to be within the overlapping region of ORF1/ORF2 (GII.9/GII.6, respectively) and was determined by Simplot at nucleotide position 5,032 bp.

Keywords Noroviruses - Intergenotypic recombinant GII.9/GII.6 - Raw sewages - Clinical samples - Central Greece

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι Νοροϊοί αποτελούν σημαντικά ανθρώπινα παθογόνα, γνωστά για την πρόκληση μη βακτηριακής οξείας επιδημικής γαστρεντερίτιδας.

Η επιτυχής κλωνοποίηση του γονιδιώματος του ιού, επέτρεψε να χαρακτηριστεί ο ιός ως *Calicivirus*, δηλαδή ότι κατέχει ένα γραμμικό, θετικής πολικότητας, μονόκλωνο RNA (ssRNA) γένωμα, 7,7 κιλοβάσεων περίπου, το οποίο προστατεύεται από το περιβάλλον από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο, αλλά δεν περιβάλλεται από φάκελο. Στο 5' άκρο του γενώματος βρίσκεται συνδεδεμένη μια πρωτεΐνη (VPg) ενώ το 3' άκρο του περιλαμβάνει ουρά πολυαδενίνης (polyA). Επίσης, το ιικό γονιδίωμα οργανώνεται σε τρία ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs). Το ORF1 κωδικοποιεί για μια πολυπρωτεΐνη, η οποία παράγει τις ώριμες μη δομικές πρωτεΐνες του ιού. Τα υπόλοιπα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF2 και ORF3) κωδικοποιούν για τις δομικές πρωτεΐνες, εκ των οποίων η VP1 είναι υπεύθυνη για τις αντιγονικές ιδιότητες του ιού.

Στην παρούσα πτυχιακή, η αρχική ανίχνευση Νοροϊών, πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή της τεχνικής RT-PCR με ήδη υπάρχοντα από την βιβλιογραφία εκκινητικά μόρια και εφαρμόσθηκαν οι *autonested*, *nested* ή *seminested* PCR. Η ανίχνευση ενός θετικού για Νοροϊούς κλινικού δείγματος, επέτρεψε την αλληλούχιση περιοχών του γονιδιώματος και την μετέπειτα χρήση των αποτελεσμάτων αυτών, για τον σχεδιασμό νέων εκκινητικών μορίων, προκειμένου να επιτευχθεί η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος. Τελικά, επιτεύχθηκε η αλληλούχιση μιας περιοχής η οποία περιλαμβάνει το 3' άκρο του ORF1, ολόκληρο το ORF2 και το 5' άκρο του ORF3.

Σε μια προσπάθεια να διακρίνουμε την κυκλοφορία ενός διαγενοτυπικού ανασυνδυασμένου GII.9/GII.6 στελέχους, ερευνήσαμε NoVs πρώτα σε λύματα από το 2006-2011 και συγκρίναμε τα αποτελέσματα με τους ιούς που ανιχνεύθηκαν σε κλινικά δείγματα στην ίδια περιοχή και στο ίδιο χρονικό διάστημα. Δύο συγκεκριμένα ζεύγη εκκινητών για Νοροϊούς σχεδιάστηκαν τα οποία ενισχύουν μια γενωμική περιοχή που καλύπτει το εκτενές σημείο ανασυνδυασμού στην ένωση

των γονιδίων ORF1/ORF2. Με βάση τη γενετική ανάλυση εντοπίστηκαν, ανασυνδυασμένα στελέχη GII.9/GII.6. Δεκατέσσερα από τα δεκαπέντε δείγματα του περιβάλλοντος και οκτώ από τα δέκα κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν θετικά, με τα δύο ζεύγη εκκινητών, επιβεβαιώνοντας ότι ο ανασυνδυασμένος διαγενοτυπικός GII.9/GII.6 Νοροϊός κυκλοφορούσε στον πληθυσμό της κεντρικής Ελλάδας από το 2006-2011. Το σημείο crossover προσδιορίστηκε στο τμήμα εντός της περιοχής επικάλυψης των γονιδίων ORF1/ORF2 (GII.9/GII.6) και προσδιορίστηκε με Simplot στη νουκλεοτιδική θέση 5032bp.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εισαγωγικά Στοιχεία

Οι Νορβοιοί ευθύνονται για την πρόκληση επιδημικών εκδηλώσεων σοβαρής γαστρεντερίτιδας σε επίπεδο πληθυσμών. Τα κέντρα ελέγχου και πρόληψης, που είναι υπεύθυνα για την καταγραφή περιπτώσεων με την αναμενόμενη κλινική εικόνα, υποβάλλουν ετήσιες εκθέσεις. Οι ιοί αυτοί αποτελούν σημαντικά ανθρώπινα παθογόνα υπεύθυνα για πάνω από το 96% όλων των περιπτώσεων μη βακτηριακής οξείας επιδημικής γαστρεντερίτιδας, με τουλάχιστον 23 εκατομμύρια μολύνσεις ετησίως μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (1) και παγκοσμίως προκαλούν μέχρι και το 50% όλων των κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας (2), με αποτέλεσμα να αποτελούν την πιο κοινή αιτία εμφάνισης σποραδικής διάρροιας σε επίπεδο πληθυσμού (3).

Το όνομά τους προέρχεται από τον ιό του γένους Norwalk, που ήταν ο πρώτος ιός που ανακαλύφθηκε. Για την εξακρίβωση του αιτιολογικού παράγοντα διαφόρων κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας, χορηγήθηκαν εκχυλίσματα κοπράνων, ελεύθερων βακτηρίων από προσβεβλημένους ασθενείς σε εθελοντές. Στη συνέχεια με φυσικοχημική επεξεργασία των παρασκευασμάτων αυτών διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για έναν μικρό σε μέγεθος (<36nm), αιτιολογικό παράγοντα ιικής φύσης. Υπήρξαν προσπάθειες αναπαραγωγής του παράγοντα αυτού σε κυτταροκαλλιέργειες και σε πειραματόζωα όμως, χωρίς επιτυχία (4).

Το 1972, για πρώτη φορά παρατηρήθηκε ο ιός μέσω ανοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας (IEM). Τα σωματίδια του ήταν σφαιρικά, μικρού μεγέθους (από 27nm έως 32nm), με ένδειξη επιφανειακής δομής. Η μικροσκόπηση πραγματοποιήθηκε σε διηθήματα κοπράνων από τους εθελοντές των κρουσμάτων του Norwalk και από τους εθελοντές που ακολούθως μολύνθηκαν. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εύρεση του ιού βασίστηκε στην κατακρήμνιση ικών σωματιδίων, από τον ορό ασθενών, που ευρίσκονταν σε φάση ανάρρωσης, μετά την αντίδραση αντιγόνου – αντισώματος (5).

Με την πάροδο του χρόνου ανακαλύφθηκαν και άλλοι ιοί, οι οποίοι έχουν την ικανότητα πρόκλησης κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας και εμφανίζουν παραπλήσια μορφολογική δομή με τον ιό του Norwalk, όπως ο Hawaii και ο Snow Mountain (6,7) οι οποίοι έχουν διαχωριστεί από τους Νοροϊούς και φέρουν το όνομα SLVs (Sapporo-likeviruses) (8).

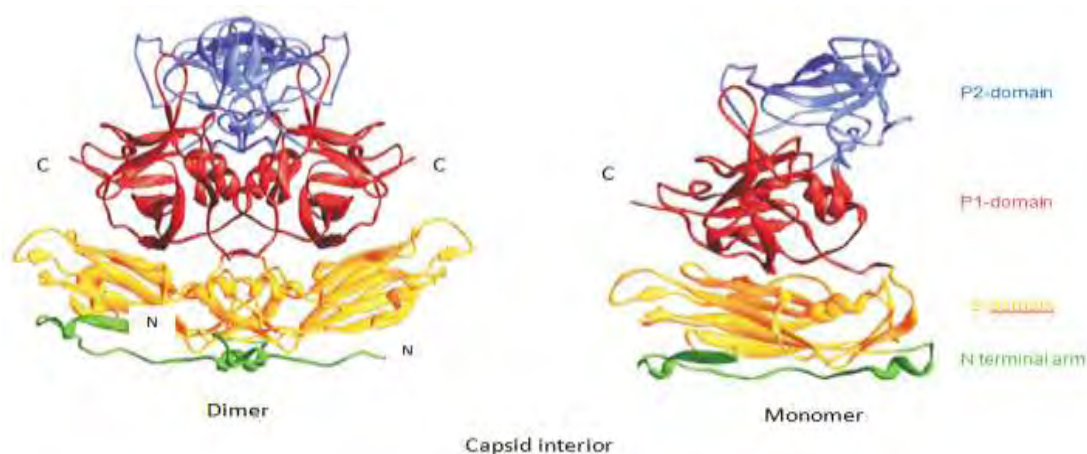
Από τα τέλη της δεκαετίας του '80, ξεκίνησε η προσπάθεια για την μοριακή ανάλυση των Νοροϊών. Αρχικά χαρακτηρίστηκε ότι ο ιός είναι RNA γενώματος και εν συνεχεία, ότι είναι μέλος των Caliciviridae. Με περαιτέρω ανάλυση του γενώματος του Norwalk ιού (9), καθώς και των γενωμάτων και άλλων Νοροϊών που εμπλέκονται στην μολυσματική γαστρεντερίτιδα, το 1993 ανακοινώθηκε η πλήρης αλληλουχία του Southampton ιού. Ο συγκεκριμένος ιός απομονώθηκε από ένα παιδί 2 ετών, που είχε προσβληθεί, στο Southampton του Ηνωμένου Βασιλείου το 1991 (10). Στη συνέχεια κλωνοποιήθηκαν ιοί, που ευθύνονται για προσβολή σε ζωικούς οργανισμούς εμπορικής εκμετάλλευσης, όπως ο SW43 των χοίρων και ο Jena των βοοειδών, οι οποίοι τελικά χαρακτηρίστηκαν ως Νοροϊοί, (11,12).

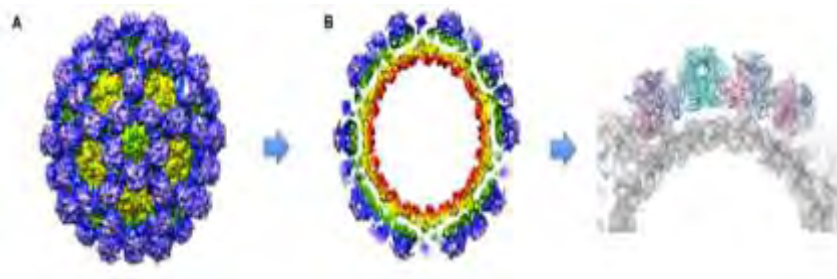
Σήμερα, χρησιμοποιούνται οι αντιδράσεις RT-PCR για την ειδική διάγνωση του Νοροϊού (13), οι οποίες παρέχουν αποτελέσματα μέσα σε λίγες ώρες. Οι δοκιμασίες είναι πολύ ευαίσθητες και μπορεί να ανιχνεύσουν λίγα σωματίδια του ιού (ακόμη και λιγότερα από 10). Ωστόσο η ανίχνευση τους είναι μία δύσκολη διαδικασία, κυρίως λόγω της ιδιαίτερα μεταβλητής νουκλεοτιδικής φύσης του ιού αλλά και λόγω των επιπτώσεων που υφίσταται η συγκέντρωση του κατά την εξαγωγή του, από το προς εξέταση δείγμα. Δοκιμές όπως ELISA που χρησιμοποιούν μείγματα αντισωμάτων έναντι Νοροϊών είναι εμπορικά διαθέσιμες, αλλά υπολείπονται σε ειδικότητα και ευαισθησία.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Η κλωνοποίηση του γονιδιώματος του ιού, από δείγματα κοπράνων (14), επέτρεψε να χαρακτηριστεί ο ιός ως Calicivirus. Κατέχει ένα γραμμικό, θετικής πολικότητας, μονόκλωνο RNA (ssRNA) γένωμα, 7,7 κιλοβάσεων περίπου, το οποίο βρίσκεται σε ένα πρωτεϊνικό καψίδιο για να προστατεύεται από το περιβάλλον καθώς δεν

περιβάλλεται από φάκελο. Το καψίδιο αυτό αποτελείται από μια σημαντική πρωτεΐνη, την VP1, και μερικά αντίγραφα μιας δεύτερης μικρής βασικής δομικής πρωτεΐνης την VP2, (14-16). Οι νοριοί διακρίνονται σε πέντε τουλάχιστον γενετικές ομάδες. Η ταξινόμηση τους γίνεται κυρίως με βάση την ομοιότητα τους στις ιδιαίτερα συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος, όπως της RNA-εξαρτώμενης πολυμεράσης RNA (RdRp) και της περιοχής της VP1 καψιδικής πρωτεΐνης (17,18). Από αυτές τις γενετικές ομάδες δύο περιέχουν την πλειοψηφία των νοριών που προσβάλλουν τον άνθρωπο, οι genogroups I και II (GI και GII). Οι νοριοί των γενετικών ομάδων GI και GII μπορούν να υποδιαιρεθούν περαιτέρω σε γενότυπους (clusters). Οι παθογόνοι caliciviruses που προσβάλλουν κυρίως τα βοοειδή, συγκεντρώνονται σε μία προτεινόμενη GIII ομάδα, αν και τα μέλη του εμφανίζουν πιο πολλές ομοιότητες με την ομάδα GI (19-21). Στην GIV ομάδα τοποθετούνται δύο στελέχη νοριών που είναι παθογόνα για τον άνθρωπο (22). Οι ομάδες GI, GII και GIII υποδιαιρούνται περαιτέρω σε 8, 19 και 2 διαφορετικούς γενότυπους αντίστοιχα, ενώ οι ομάδες GIV και GV περιλαμβάνουν από έναν μόνο γενότυπο (23). Για να γίνει δυνατή η ταξινόμηση τους, χρησιμοποιούνται συστήματα γενοτυπικής ανάλυσης των στελεχών, βασιζόμενα στη γενετική συγγένεια που εμφανίζει η κύρια καψιδική πρωτεΐνη (στην πλήρη ή μερική αλληλουχία), η οποία αντιστοιχεί στην αντιγονική μοναδικότητα που εμφανίζει το κάθε στέλεχος. Αν και διάφορα στελέχη του ιού μπορούν να εμφανιστούν ταυτόχρονα και διαφορετικά σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές και σε διαφορετικούς χρόνους, εντοπίστηκε η κυκλοφορία ενός σπάνιου διαγενοτυπικού ανασυνδυασμένου νοριού GII.9/GII.6 στην κεντρική Ελλάδα.





Εικόνα 2. (Α) Η δομή των μορίων του Norwalk (NV VLP). Μικροσκοπική αναδημιουργία με χρήση κρυό – ηλεκτρονικής μικροσκοπίας 22Α° και ακτίνων Χ, κρυσταλλογραφία σε 34Α°. Το NV VLPs συγκεντρώνει 90 διμερή του πρωτεϊνικού καψιδίου (αριστερά, διάγραμμα κορδελλών) σε εικοσαεδρική συμμετρία. (Β) Διατομή του NV VLP. Κάθε μονομερής καψιδική πρωτεΐνη (δεξιά, διάγραμμα κορδελλών) διαιρείται σε μία άμινο-τελική περιοχή βραχιόνων, που βρίσκεται αντιμέτωπη με το εσωτερικό του VLP, περιοχή κοχυλίων (S-περιοχή, κόκκινο) διαμορφώνοντας την συνεχή επιφάνεια του και μια προεξέχουσα περιοχή (Ρ-περιοχή) η οποία προέρχεται από την επιφάνεια των S-περιοχών. Η Ρ-περιοχή διαιρείται περαιτέρω σε υποπεριοχές, τις Ρ1 και Ρ2 (πράσινο και μπλε, αντίστοιχα) με την Ρ2-υποπεριοχή να βρίσκεται στην πιο ακραία επιφάνεια του VLPs. Οι Ρ περιοχές (μπλε και πράσινο) πάνω από το κέλυφος (κίτρινο) δημιουργούν το εξωτερικό στρώμα του καψιδίου.

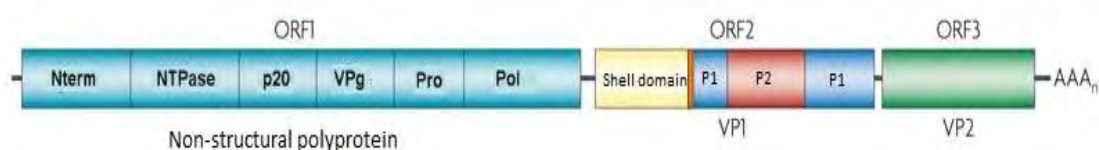
1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ

Γενικά χαρακτηριστικά

Οι νοροιοί χαρακτηρίζονται από υψηλή μολυσματικότητα, καθώς λιγότερα από 10 ιοσωμάτια ανά άτομο (ID50) μπορούν να προκαλέσουν κλινικά συμπτώματα. Εμφανίζουν σταθερότητα στο περιβάλλον όπου βρίσκονται, ανθεκτικότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες, στην απολύμανση με χλώριο, οινόπνευμα και στα μέτρα αποστείρωσης (απολύμανση χεριών) (24). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κανένα φάρμακο ή εμβόλιο για θεραπεία ή αποτροπή της ανθρώπινης ασθένειας από τον ιό. Αυτό οφείλεται κυρίως στην απουσία ενός συστήματος κυτταροκαλλιέργειας ή στην εύρεση ενός κατάλληλου μικρού ζωικού προτύπου για περαιτέρω μελέτη της βιολογίας του ιού (25,26).

Γονιδιακή οργάνωση

Είναι ένας ιός θετικής πολικότητας με μονόκλωνο RNA, περίπου 7.700 βάσεων, με τρία ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs), που κωδικοποιούν δομικά και μη δομικά γονίδια (εικ. 3). Το ιικό RNA συνδέεται ομοιοπολικά με μια πρωτεΐνη, την VPg (που προέρχεται από τον ιό), η οποία παρέχει ένα κάλυμμα στο 5' άκρο και είναι πολύ πιθανό να παίζει κάποιο ρόλο στην μεταφορά του γονιδιώματος στις περιοχές αρνητικής σύνθεσης των κλώνων, ενώ στο 3' άκρο του γονιδιώματος υπάρχει μια πολυΑ ουρά (27). Το ORF1 είναι πάνω από 5 KB και περιλαμβάνει τα πρώτα 2/3 του γονιδιώματος (εικ. 3). Το τελικό 1/3 του γονιδιώματος περιλαμβάνει τις δύο δομικές πρωτεΐνες, την ORF2 (~1,8 KB) που κωδικοποιεί την 57 kDa δομική καψιδική πρωτεΐνη VP1 και την ORF3 (0,6 KB) που κωδικοποιεί μια μικρότερη δευτερεύουσα βασική πρωτεΐνη 22 kDa, στην οποία αποδίδεται η συσκευασία του γονιδιώματος σε ιοσωμάτια (εικ. 3).



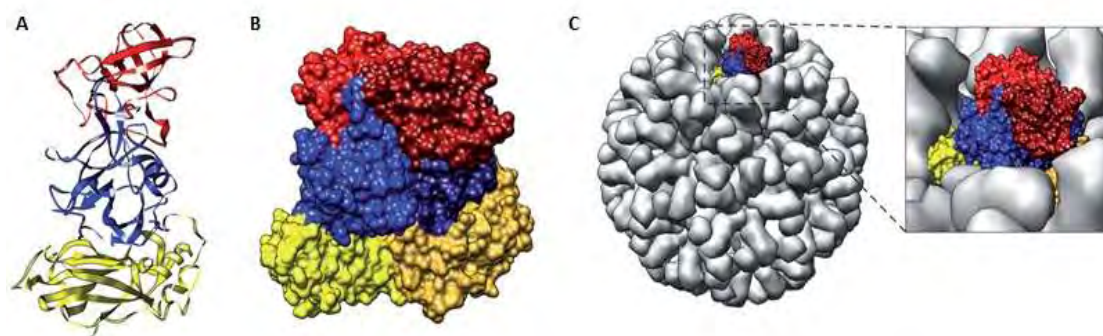
Εικόνα 3. Η γονιδιακή δομή και οι περιοχές του καψιδίου των νοροϊών. Το γονιδίωμα των νοροϊών αποτελείται από τρία ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης: ORF1, που κωδικοποιεί τις μη δομικές πρωτεΐνες (ανοικτό μπλε), ORF2 και ORF3 που κωδικοποιούν τις δομικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της VP1 (σημαντικότερη καψιδική πρωτεΐνη) και της VP2 (δευτερεύουσα δομική πρωτεΐνη). Το μη δομικό πολυπρωτεϊνικό μέρος υποβάλλεται σε επεξεργασία από την ιική Pro (3C-like protease) σε έξι ώριμες πρωτεΐνες: τη N-term, τη N-terminal πρωτεΐνη, τη NTPase, την p20 της οποίας η λειτουργία παραμένει άγνωστη και την VPg, η οποία βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένη στο 5' άκρο του γονιδιώματος. Η σημαντικότερη πρωτεΐνη η VP1 του καψιδίου διαιρείται περαιτέρω σε δύο κύριες περιοχές, την περιοχή κελύφους (S) και την περιοχή του προεξέχοντος βραχίονα (P). Η περιοχή P διαιρείται περαιτέρω σε P1 και P2. Μια εύκαμπτη περιοχή εμφανίζεται στον σχηματισμό του κελύφους και της P1 (πορτοκαλί).

Δομή ιοσωματίου

Η καψιδική πρωτεΐνη του ιού έχει την ικανότητα να μετατρέπεται αυτόματα σε ιικά σωματίδια (virus-like, VLPs), τα οποία είναι μορφολογικά και αντιγονικά όμοια με τον εγγενή ιό (28,29), περιέχουν δηλαδή τις σημαντικότερες ανοσοποιητικές και αντιγονικές ιδιότητες των στελεχών του ιού που αντιπροσωπεύουν. Όταν παράγονται σε επαρκείς ποσότητες αποτελούν σημαντικά αντιδραστήρια για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ιού και των μορίων στόχων. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται ανασυνδυασμένα συστήματα έκφρασης για την άφθονη παραγωγή καψιδικής πρωτεΐνης.

Δύο συστήματα έκφρασης που έχουν ξεχωρίσει μέχρι στιγμής είναι το Baculovirus replicon και το Venezuelan equine encephalitis (VEE) replicon (30). Το σύστημα replicon Baculovirus χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ενός VLP του ιού Norwalk (NV) (GI.1). Ο ιός που προέκυψε χαρακτηρίστηκε με την βοήθεια της Cryo – EM (κρυο – ηλεκτρονική μικροσκοπία), της κρυσταλλογραφίας ακτίνας Χ και της υπολογιστικής απεικόνισης και αποκάλυψε τη δομή του καψιδίου των νοροϊών, (31,32) (εικ 4). Η κρυσταλλική δομή του ιού, έδειξε ότι το ιικό καψίδιο συγκροτείται χρησιμοποιώντας 180 αντίγραφα της καψιδικής πρωτεΐνης, τα οποία οργανώνονται σε 90 διμερή με μια εικοσαεδρική συμμετρία $T=3$ (32). Επιπλέον, ευδιάκριτα διμερή ενώνονται και διαμορφώνουν μια υψηλότερη δομή προσδίδοντας στο μόριο το σχήμα κυπέλλου, (31), (εικ. 4).

Έτσι, τα διμερή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για τη διαμόρφωση του εσωτερικού κοχυλίου, του καψιδίου (εικ.4B), ενώ επεκτείνονται πέρα από την επιφάνεια. Το πλήρες καψίδιο (εικ. 4C) εκμεταλλεύεται την στρατηγική αυτή και διαμορφώνει ένα σφιχτό ιικό καψίδιο με τις απαραίτητες προεξοχές στην επιφάνεια, οι οποίες μπορούν και αλληλεπιδρούν με τον κυτταρικό υποδοχέα, καταστρώνοντας έτσι εφικτή την ιική πρόσδεση και είσοδο.



Εικόνα 4. (Α). Οι περιοχές και οι υποπεριοχές του καψιδικού μονομερούς NV. (Β). Διμερές, αποτελείται από δύο μονομερή, το ένα από την μια αλυσίδα του ενός μονομερούς (παρουσιάζεται με «ανοιχτές» σκιές) και το άλλο από την αλυσίδα του δεύτερου μονομερούς (παρουσιάζεται με πιο σκούρες σκιές). Το μονομερές διαιρείται σε δύο περιοχές, την περιοχή σχηματισμού κοχύλι (κίτρινη) και τις προεξέχουσες περιοχές (Ρ). Η περιοχή Ρ διαιρείται περαιτέρω σε Ρ1 (μπλε) και Ρ2 (κόκκινο). Η Ρ1 είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση του διμερούς, ενώ η Ρ2 είναι η περισσότερο εκτεθειμένη υποπεριοχή του ιού. Υπάρχει και μια εύκαμπτη περιοχή που βρίσκεται μεταξύ της S και της Ρ περιοχής, που επιτρέπει την ευελιξία για τη διαμόρφωση του σχηματισμού του καψιδίου. (C) Η αλληλεπίδραση των διμερών διαμορφώνει έναν σχηματισμό που έχει μορφή «σφιχτό κοχύλι» (σφιχτό καψίδιο με προεξοχές).

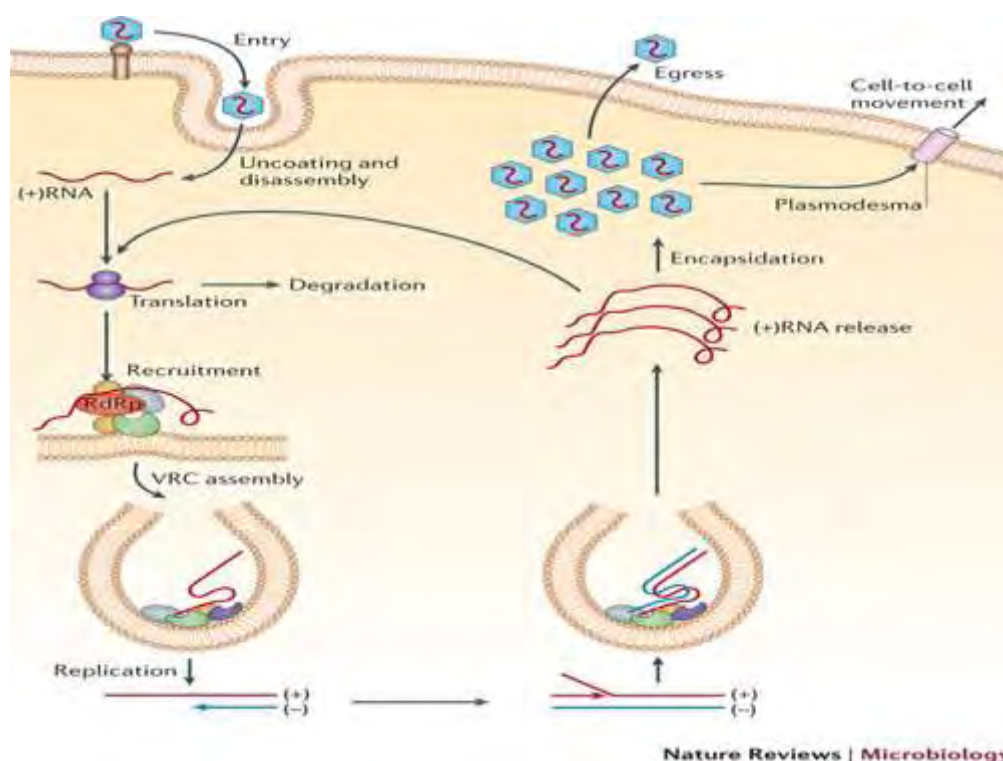
Το μονομερές διαιρείται περαιτέρω σε δύο περιοχές γνωστές ως περιοχή κοχυλίων (S), η οποία διαμορφώνει τον εσωτερικό πυρήνα και την προεξέχουσα περιοχή (Ρ), που συνδέεται με μια εύκαμπτη άρθρωση (εικ. 3). Η περιοχή Ρ διαμορφώνει τις χαρακτηριστικές προεξοχές που εκτείνονται μακριά από τη δομή, (31) και διαιρείται με την σειρά της σε δύο υποπεριοχές. Οι υποπεριοχές αυτές περιλαμβάνουν, την Ρ1 (αμινοξέα 226-278 και 406-520), που ενεργεί ως περιοριστική περιοχή μεταξύ του S και της δεύτερης Ρ κατηγορίας και την Ρ2, η οποία είναι η περισσότερο εκτεθειμένη περιοχή της καψιδικής πρωτεΐνης (αμινοξέα 279-405), (31). Η ακολουθία της Ρ2 είναι η πιο μεταβλητή περιοχή στο γονιδίωμα των νοριών, περιέχει την περιοχή δέσμευσης υδατανθράκων (S) και ένα μοτίβο παρόμοιο με μια RNA – δεσμεύουσα περιοχή, (31, 33-35).

Η αντιγραφή του γενωμικού RNA εντοπίζεται στην περιοχή συγκρότησης, οδηγούμενη πιθανόν από τοπικά σήματα στην ORF1 γενωμική περιοχή (36), όπου και πακετάρεται σε ιοσωμάτια. Τα επόμενα στάδια της συναρμολόγησης του ιικού

σωματιδίου, της ωρίμανσης και της περαιτέρω απελευθέρωσης του από το κύτταρο ξενιστή δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητά. Έχει αποδειχθεί ότι τα VPg – συνδεδεμένα γενωμικά και υπογενωμικά RNA μόρια δεν συσχεύονται μαζί στο ίδιο ιοσωμάτιο, αφού σε πειραματικές προσεγγίσεις βρέθηκε, ότι υπάρχει το κάθε είδος μορίου σε σωματίδια διαφορετικών πυκνοτήτων, (37). Ο μηχανισμός αντιγραφής του ιού παραμένει, εν μέρει, άγνωστος. Το γενωμικό RNA λειτουργεί ως εκμαγείο για την σύνθεση του αρνητικού κλώνου, ο οποίος στη συνέχεια χρησιμοποιείται για την αντιγραφή ολόκληρου του θετικού RNA γενώματος, το οποίο χρησιμοποιείται με την σειρά του για την παραγωγή νέων ιικών σωματιδίων και για την παραγωγή υπογενωμικών RNA. Κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του γενωμικού θετικού κλώνου και του υπογενωμικού RNA, η πολυμεράση ουριδυλιώνει την VPg πρωτεΐνη, παρουσία του πολυαδενυλιωμένου γενωμικού RNA και έτσι η VPg διεγείρει την έναρξη της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου. Η πολυμεράση δεν απαιτεί εκκινητικά μόρια για την αντιγραφή του αρνητικού κλώνου RNA.

Αντιγραφή του ιικού RNA

Αν και οι νοοιοί περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1972, (38, 39), ο μηχανισμός αντιγραφής του ιού παραμένει, εν μέρει, άγνωστος. Πιστεύεται ότι το γενωμικό RNA λειτουργεί ως εκμαγείο για την σύνθεση του αρνητικού κλώνου, ο οποίος τελικά χρησιμοποιείται για την αντιγραφή ολόκληρου του θετικού RNA γενώματος, το οποίο χρησιμοποιείται με την σειρά του για την παραγωγή νέων ιικών σωματιδίων και για την παραγωγή υπογενωμικών RNA. Έτσι καταλήγουμε στο συμπέρασμα, ότι κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του γενωμικού θετικού κλώνου και του υπογενωμικού RNA, η πολυμεράση ουριδυλιώνει την VPg πρωτεΐνη, παρουσία του πολυαδενυλιωμένου γενωμικού RNA και έτσι η VPg διεγείρει την έναρξη της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου. Η πολυμεράση δεν απαιτεί εκκινητικά μόρια για την αντιγραφή του αρνητικού κλώνου RNA. Ακολούθως, η αντιγραφή του γενωμικού RNA εντοπίζεται στην περιοχή συγκρότησης, οδηγούμενη πιθανόν από τοπικά σήματα στην ORF1 γενωμική περιοχή (36), όπου και πακετάρεται σε ιοσωμάτια.



Εικόνα 5. Αντιγραφή RNA ιού θετικής πολικότητας.

Τα επόμενα στάδια της συναρμολόγησης του ιικού σωματιδίου, της ωρίμανσης και της περαιτέρω απελευθέρωσης του από το κύτταρο ξενιστή δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστά. Έχει αποδειχθεί ότι τα VPg – συνδεδεμένα γενωμικά και υπογενωμικά RNA μόρια δεν συσκευάζονται μαζί στο ίδιο ιοσωμάτιο, αφού σε πειραματικές προσεγγίσεις βρέθηκε, ότι υπάρχει το κάθε είδος μορίου σε σωματίδια διαφορετικών πυκνοτήτων, (37).

Μετάφραση, επεξεργασία και λειτουργία των ιικών πρωτεϊνών

Η ORF1 πρωτεΐνη, μεταφράζεται σε μία μεγάλη πολυπρωτεΐνη, η οποία αυτοδιασπάται σε έξι μη δομικές πρωτεΐνες από την ιική 3C – κυστεϊνική πρωτεϊνάση (εικ.1). Τα επεξεργασμένα πρωτεϊνικά προϊόντα από το N – άκρο προς C – άκρο περιλαμβάνουν τα εξής: μία N – τελική πρωτεΐνη (p48) μεταξύ 37 – 48 kDa, μια 2C –νουκλεοτιδική τριφωσφατάση (NTPase) περίπου 40 kDa, μια 3A πρωτεΐνη περίπου 20 kDa (p20), την VPg πρωτεΐνη (16 kDa) η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη

στο 5' άκρο του γονιδιώματος, την 3C πρωτεΐνάση (Pro) 19 kDa και την 3D – RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (Pol) μεγέθους 57 kDa, (40).

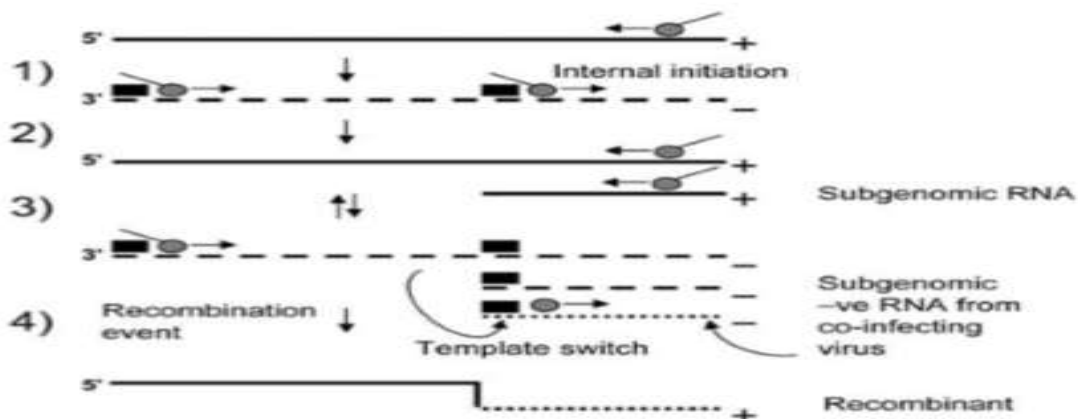
Η λειτουργία της N – τελικής πρωτεΐνης (p48) παραμένει ακόμη άγνωστη, ωστόσο, η έκφραση της p48 *in vitro* εντοπίστηκε στην συσκευή Golgi των κυττάρων, οδηγώντας έτσι, στην υπόθεση ότι παίζει ρόλο στην μεμβρανική αναδιάταξη και στην ενδοκυττάρια κίνηση, (41,42). Η νουκλεοτιδική τριφωσφατάση (NTPase) δεσμεύει και υδρολύει NTPs, ενώ η VPg πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για την μεταγραφή και είναι πολύ πιθανό να παίζει ρόλο στην έναρξη της μετάφρασης, όπως έχουν δείξει πρόσφατες μελέτες, (43-47).

Η πρωτεάση (Pro), μοιράζεται ομοιότητες με την κυτταρική χυμοθρυψίνη-like πρωτεάση σερίνης, (47) και περιέχει την ίδια αλληλουχία αμινοξέων που έχουν βρεθεί και στην 3C πρωτεΐνάση των *ricorna* ιών. Επίσης, επεξεργάζεται την πολυπρωτεΐνη ORF1 των νοριών στις μεμονωμένες μη δομικές πρωτεΐνες, (48-51). Η ενεργή πλευρά της Pro περιλαμβάνει την καταλυτική ομάδα των His30, Glu54 και Cys139, που εντοπίζονται στο κέντρο μίας βαθιάς σχισμής μεταξύ του N και του C τελικού άκρου όπου ενώνονται με δεσμούς υδρογόνου, (52-54). Η His 157, είναι απαραίτητη στο υπόστρωμα πρόσδεσης, (55). Η πρωτεάση (Pro), εκτός από τον βασικό της ρόλο στην επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης, εμποδίζει την κυτταρική μετάφραση διασπώντας συγκεκριμένες περιοχές των κυτταρικών πρωτεϊνών, οι οποίες προσδένουν τους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης και το RNA, (56).

Η Pol των νοριών, έχει αποδειχτεί ότι είναι θεμελιώδης για την *in vitro* ιική αντιγραφή και εντάσσεται σαν μέλος της οικογένειας των Gly–Asp–Asp (GDD) πολυμερασών, όπου ανήκουν και πολλοί άλλοι θετικής πολικότητας RNA ιοί (56). Οι λειτουργίες της ιικής Pol στην αντιγραφή του ιικού γενώματος, για την σύνθεση του RNA, πραγματοποιούνται με την χρησιμοποίηση ενός VPg – εκκινητικού μηχανισμού και της πολυαδενυλιωμένης ουράς στο 3' άκρο ως εκμαγείο (56).

Ανασυνδυασμός

Ο πρωταρχικός μηχανισμός που εμπλέκεται στον ανασυνδυασμό των RNA ιών είναι το μοντέλο αντιγραφής-επιλογής (copy-choice model), (57) . Σε αυτό το μοντέλο, ο ομόλογος ανασυνδυασμός οδηγείται από την ιογενή κωδικοποιημένη RdRp όταν συμβαίνει παύση κατά τη διάρκεια της μεταγραφής μιας περιοχής της δευτεροταγούς δομής . Μια σειρά μοντέλων υπογονιδιωματικής σύνθεσης έχουν προταθεί , αλλά το πιο ευρέως αναγνωρισμένο είναι ο μηχανισμός εσωτερικής ενεργοποίησης (ή εσωτερικός εναρκτήριο μηχανισμός), (58). Εδώ η αντιγραφάση (replicase) ξεκινά τη υπογενωμική μεταγραφή του θετικού κλώνου εσωτερικά ενός αρνητικού κλώνου αντίγραφο του γενωμικού RNA, (59) . Χρησιμοποιώντας αυτά τα 2 καλά υποστηριζόμενα μοντέλα , προτείνουμε ένα απλό μηχανισμό ανασυνδυασμού (εικόνα 6) . Αντιγραφή και εσωτερική υπογενωμική σύνθεση RNA παράγουν 2 θετικά είδη RNA. Αυτά τα πρότυπα άμεσης σύνθεσης RNA που οδηγούν στην παραγωγή δυο πλήρους μήκους αρνητικού γονιδιώματος και στην παραγωγή αρνητικού υπογονιδιωματικού RNA είδους, στο δεύτερο γύρο της αντιγραφής. Το αρνητικό υπογενωμικό RNA είναι ο βασικός παράγοντας στο προτεινόμενο μοντέλο, και τέτοια είδη έχουν ταυτοποιηθεί σε ιούς που παράγουν υπογενωμικό RNA, (60). Προτείνεται ότι ο ανασυνδυασμός συμβαίνει όταν το ένζυμο εκκινεί τη σύνθεση του θετικού κλώνου στο άκρο 3' του πλήρους μήκους αρνητικού κλώνου , χάνει την ικανότητα να επεξεργάζεται το βλαστικό βρόγχο της αλληλεπικάλυσης ORF1/ORF2 , μετά πηδάει πέρα (εναλλαγή προτύπου) σε ένα διαθέσιμο αρνητικό υπογονιδιωματικό είδος RNA που παράγεται από ένα συν- μολύνοντα ιό (εικόνα 6, 3^ο βήμα). Εναλλακτικά, η RdRp θα μπορούσε επίσης να μεταβεί απευθείας από το ένα γενωμικό RNA στο άλλο γενωμικό RNA στην άκρως συντηρημένη επικάλυψη ORF1/ORF2. Το καθαρό αποτέλεσμα και από τις δύο πιθανότητες είναι ένας ανασυνδυασμένος ιός, ο οποίος έχει αποκτήσει νέες αλληλουχίες ORF2 και ORF3. Ο ανασυνδυασμός προσφέρει στον NoV ένα ελκυστικό μηχανισμό για ανοσοποιητική διαφυγή. Οι υπογονιδιωματικοί RNA προαγωγοί έχουν προταθεί ως ενεργά σημεία ανασυνδυασμού, (61,62).



Εικόνα 6. Ένας απλός μηχανισμός ανασυνδυασμού σε νοροϊούς. 1) μεταγραφή του RNA από την RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp) (γκρι κύκλος), παράγει ένα αρνητικού κλώνου ενδιάμεσου (διακεκομμένη γραμμή). 2) Η δέσμευση της RdRp στις σχεδόν ταυτόσημες αλληλουχίες υποκινητή RNA (γεμάτα κουτιά) δημιουργία θετικού κλώνου (ευθεία γραμμή) σε γονιδιώματα και υπογενωμικό RNA. 3) Αυτά τα πρότυπα συνθέτουν άμεσα RNA από το 3' άκρο, που οδηγεί στη δημιουργία ενός πλήρους μήκους αρνητικού γονιδιώματος και σε αρνητικά υπογονιδιωματικά είδη RNA. 4) Ανασυνδυασμός συμβαίνει όταν το ένζυμο εκκινεί τη σύνθεση του θετικού κλώνου στο άκρο 3' του πλήρους μήκους αρνητικού κλώνου, σταματά στον υπογονιδιωματικό προαγωγέα, και στη συνέχεια το πρότυπο αλλάζει κλώνο και πάει σε ένα διαθέσιμο αρνητικό υπογονιδιωματικό RNA είδος, που δημιουργήθηκε από ένα συν-μολύνοντα ιό. Το καθαρό αποτέλεσμα είναι ένας ανασυνδυασμένος ιός ο οποίος έχει αποκτήσει νέο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF).

Φαινοτυπική ποικιλία λόγω ανασυνδυασμών

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο ιογενής ανασυνδυασμός είναι σημαντικός, διότι μπορεί να δημιουργήσει νέους ιούς απογόνους που εκφράζουν νέα αντιγονικά χαρακτηριστικά ή και νέα χαρακτηριστικά μολυσματικότητας. Για παράδειγμα, οι νέοι ιοί απόγονοι μπορεί να έχουν νέες επιφανειακές πρωτεΐνες που τους επιτρέπουν να μολύνουν προηγουμένως ανθεκτικά άτομα.

1.3 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Απαραίτητη προϋπόθεση για την είσοδο του ιού στα κύτταρα, αποτελεί η αναγνώριση του υποδοχέα στην επιφάνεια τους. Συγκεκριμένα, η σύνδεση των νοροϊών με τα κύτταρα ξενιστές περιλαμβάνει την αλληλεπίδρασή τους με ειδικούς υδατανθρακικούς (Histoblood Group Antigens) υποδοχείς (63). Η ικανότητα των νοροϊών να προσδένονται στους HBGAs υποδοχείς, πιθανολογείται ότι καθορίζεται από ειδικά αμινοξέα, τα οποία εντοπίζονται στην P2 υποπεριοχή του καψιδίου. Μέχρι σήμερα, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για να καθοριστεί η ευαισθησία του ανθρώπινου πληθυσμού στους νοροϊούς, συγκρίνοντας στελέχη από διαφορετικές γενετικές ομάδες ή/και διαφορετικές υποομάδες. Έχει προταθεί, ότι τα στελέχη τα οποία υπάγονται σε έναν γενότυπο είναι παρόμοια και ότι οι διαφορές που τυχόν υπάρχουν μεταξύ τους, δεν επαρκούν ώστε να προκαλέσουν μια μοναδική άνοση απάντηση.

Η μελέτη των ανασυνδυασμένων στελεχών GII.9/GII.6 στην κεντρική Ελλάδα ως κύρια αιτία της μόλυνσης, καθώς και η δυνατότητα αυτών των στελεχών να προκαλέσουν πανδημικά κρούσματα σε πληθυσμούς, έχει συγκεντρώσει μεγάλο ενδιαφέρον για τον καθορισμό των χαρακτηριστικών γνωρισμάτων των στελεχών αυτών.

1.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Πρόληψη και έλεγχος

Η περίοδος επώασης, για την εμφάνιση των πρώτων χαρακτηριστικών συμπτωμάτων, μετά από την προσβολή του ιού στον άνθρωπο, είναι γενικά 24 – 48 ώρες, με τα κλινικά συμπτώματα να διαρκούν από 12 έως 72 ώρες. Η διάρκεια των συμπτωμάτων μπορεί να παραταθεί σε μερικές περιπτώσεις, ιδιαίτερα μεταξύ των ηλικιωμένων ή ανοσοκατασταλμένων ατόμων. Τα συμπτώματα της μόλυνσης του ιού περιλαμβάνουν τα εξής: εμετό (69%), διάρροια (66%), ναυτία (79%), χαμηλό πυρετό (37%) και κοιλιακούς σπασμούς (30%) (64).

Τα προερχόμενα από τον ιό σωματίδια, έχουν ανιχνευθεί μέχρι και 3 εβδομάδες μετά την παύση των συμπτωμάτων. Επίσης, επειδή η μόλυνση από νοροϊό χρειάζεται πολύ χαμηλή μολυσματική δόση και καθώς είναι εξαιρετικά σταθεροί στο περιβάλλον, η διάδοση τους πραγματοποιείται πολύ εύκολα από άνθρωπο σε άνθρωπο.

Οι μολύνσεις από τον ιό, συνδέονται συχνότερα με την κατανάλωση μολυσμένων τροφών και νερών. Η διάδοση τους γίνεται κυρίως μέσω της ανθρώπινης επαφής, της έκθεσης σε μολυσμένα αερολύματα και μέσω τις περιττωματικής οδού (65).

Τις περισσότερες φορές, τα κρούσματα εμφανίζονται μέσα σε ιδρύματα, όπως τα σχολεία, οι ιδιωτικές κλινικές, τα γηροκομεία, τα νοσοκομεία ή σε τοποθεσίες όπου η στενή ανθρώπινη επαφή είναι αναπόφευκτη, όπως σε κρουαζιερόπλοια, σε στρατιωτικά σκάφη ή και στρατιωτικές μονάδες.

Οι γενετικές ομάδες GI και GII και οι άνω των 25 διαφορετικών γενετικών γενότυπων που αυτές περιλαμβάνουν, αποτελούν την πλειοψηφία των ανθρώπινων παθογόνων.

Η ανεπαρκής γνώση και κατανόηση του μηχανισμού δράσης των νοροϊών έχει αποτελέσει ανασταλτικό παράγοντα για την ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων αντιμετώπισης τους. Μέχρι σήμερα, για την πρόληψη της εξάπλωσης της μόλυνσης συνίσταται η απομόνωση των κρουσμάτων από τον πληθυσμό, ενώ η διαχείριση αυτών αντιμετωπίζεται ανά σύμπτωμα, όπως παρεντερική ή δια στόματος χορήγηση υγρών και θεραπεία αποκατάστασης ηλεκτρολυτών (66).

Η διακοπή της μετάδοσης της μόλυνσης, αποτελεί την αρχική στρατηγική για την πρόληψη (24). Εξίσου σημαντική είναι η μετάδοση του ιού από δευτεροβάθμιους παράγοντες, όπως η κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων και νερών. Στην περίπτωση αυτή, ως αποτελεσματικότερος τρόπος μείωσης της μετάδοσης του ιού αποτελεί η τήρηση κάποιων απλών κανόνων υγιεινής όπως, χρήση σαπουνιού και ζεστού νερού για 20 δευτερόλεπτα. Ως αποτελεσματικά απολυμαντικά θεωρούνται όσα περιέχουν υποχλωριώδη, υπεροξείδιο του υδρογόνου και φαινολικά παράγωγα

(67), η πόση εμφιαλωμένου νερού και ποτών χωρίς πάγο κατά την διάρκεια ταξιδιού σε περιοχές όπου η υγιεινή του νερού είναι αμφισβητούμενη, η βρώση τροφίμων που είναι λεπτομερώς μαγειρευμένα και τέλος, η αποφυγή στενής επαφής με άτομα τα οποία εμφανίζουν στοιχεία της κλινικής εικόνας της μόλυνσης (67).

Εμβόλια

Κύριο εμπόδιο για την επιτυχή δημιουργία αποτελεσματικού εμβολίου έναντι των νοριών, αποτελεί η έλλειψη δυνατότητας κυτταροκαλλιέργειάς τους, η οποία εμποδίζει την ανάλυση του ρόλου των οροεξουδετερωτικών αντισωμάτων και το γεγονός ότι οι ίδιοι οι ιοί δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή για την παρασκευή ζωντανού ή αδρανοποιημένου εμβολίου.

Τον Σεπτέμβριο του 2009 σε συνέδριο που πραγματοποιήθηκε στην Ισπανία, παρουσιάστηκε ένα εμβόλιο κατά των νοριών, το οποίο δεν θα διατίθεται σε ενέσιμη μορφή, αλλά σε μορφή σκόνης. Η κατασκευή του εμβολίου βασίζεται στα μόρια VLP, που αποτελούν πηγή παραγωγής του καψιδιακού αντιγόνου και σε ένα μονοφωσφορικό λιπίδιο A (MonophosphorylLipid A) το οποίο ενισχύει την ρινική λήψη.

Ήδη, η πρώτη φάση των δοκιμών ασφαλείας έχει ολοκληρωθεί και τα στοιχεία που προέκυψαν, έδειξαν ότι το εμβόλιο δεν εμφάνισε καμιά σοβαρή επιπλοκή ενώ παρείχε την κατάλληλη ανοσοποίηση. Έτσι, θα μπορέσει να μειωθεί η συχνότητα της επιδημικής ιικής γαστρεντερίτιδας(68).

1.5 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα σύγχρονα εργαστηριακά τεστ που εφαρμόζονται σήμερα σε επίπεδο ρουτίνας, δεν αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση των νοριών (69). Έτσι, για την διάγνωση των νοριών, κατά τη διάρκεια των τελευταίων τριών δεκαετιών περίπου, έχουν εξελιχθεί κάποιες σημαντικές δοκιμές

οι οποίες, παρέχουν την δυνατότητα προσδιορισμού τους ακόμα και αν η συγκέντρωση του προς εξέταση δείγματος είναι σχετικά μικρή.

Ανίχνευση νουκλεϊνικού οξέος

Η κλωνοποίηση του ιού Norwalk και η μετέπειτα αλληλούχιση του, έχει οδηγήσει, με επιτυχία, στην ανάπτυξη δοκιμασιών ανίχνευσης του ιού (70). Η γνώση του γονιδιώματος του ιού, επέτρεψε τον σχεδιασμό δοκιμών υβριδοποίησης του νουκλεϊνικού οξέος καθώς και δοκιμών όπως η RT-PCR και η Real-Time ποσοτική PCR έτσι ώστε, να καταστεί εφικτή η ανίχνευση του ιού σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα.

Η RT-PCR αποτελεί την πιο ευαίσθητη διαγνωστική δοκιμή για την ανίχνευση του ιού (70). Το πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι μπορεί να ανιχνεύσει τα ιικά μόρια σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (100 particles/ml) ακόμα και μετά το πέρας της οξείας κλινικής μόλυνσης. Επίσης, η ανίχνευση των νοροϊών είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί σε δείγματα τα οποία βρίσκονται αποθηκευμένα στους 4°C και για πολλά χρόνια στους - 70°C (70). Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι οι συγκεκριμένες δοκιμές απαιτούν μεγάλη προσοχή έτσι ώστε να αποτραπεί τυχόν μόλυνση του εργαστηρίου ή επιμολύνσεις αρνητικών δειγμάτων (70) και βέβαια το γεγονός ότι απαιτείται ακριβός εξοπλισμός (71).

Κατά συνέπεια, η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κυρίως στις περιπτώσεις πραγματοποίησης επιδημικών ερευνών. Έτσι, σε επιδημιολογικό επίπεδο, μπορεί να πραγματοποιηθεί η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός στελεχών, τα οποία είναι υπεύθυνα για διάφορα κρούσματα γαστρεντερίτιδας και ταυτόχρονα να αποκαλύψει τυχόν μεταλλάξεις των κυκλοφορούντων νοροϊκών στελεχών.

Διαγνωστικές δοκιμές πρώτης γενιάς

Οι διαγνωστικές δοκιμές πρώτης γενιάς, που έχουν αναπτυχθεί για να ανιχνεύουν μολύνσεις από νοροϊούς, περιλαμβάνουν την ηλεκτρονική μικροσκοπία (άμεση), την ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία (έμμεση) και την άνοση

αιμοσυγκόλληση. Η επόμενη γενιά των δοκιμών περιλαμβάνει αυτές που αναπτύχθηκαν για την ανίχνευση των αντιγόνων των ιών Norwalk, όπως ο ραδιοανοσοπροσδιορισμός (RIA) και οι ανοσολογικές αντιδράσεις. Τέλος η Western Blot αποτελεί μια ακόμη προσέγγιση για την αξιολόγηση της αντίδρασης των αντισωμάτων σε μολυσμένα άτομα (70).

Ηλεκτρονική μικροσκοπία

Η τεχνική αυτή, αποτελεί μέθοδο για την ανίχνευση του ιού, καθώς βασίζεται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του. Το όνομα Calicivirus προέρχεται από την μορφή που εμφανίζουν τα ιικά μόρια κατά την παρατήρηση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (69). Ωστόσο, παρουσιάζονται ενίοτε εμπόδια όπως είναι η δυσκολία διαχωρισμού του ιού από άλλα σφαιρικά σωματίδια στα δείγματα που καθιστούν την μέθοδο μη αποδοτική και ακατάλληλη να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστική εξέταση ρουτίνας.

Ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία

Η πρώτη μέθοδος που εφαρμόστηκε για να προσδιορίσει τους ιούς caliciviruses ήταν η ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία (69), με χρήση ορού που περιείχε τα κατάλληλα αντισώματα, έτσι ώστε να καταστεί εφικτή η ενίσχυση του ιού. Εντούτοις, η τεχνική είναι χρήσιμη μόνο για τα δείγματα που συλλέγονται κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων της μόλυνσης (πρώτες 24 – 48 ώρες) (69 , 72).

Ανοσολογικές αντιδράσεις

Δεδομένου ότι το σύστημα έκφρασης in vitro των baculoviruses μπορεί να εκφράσει επιτυχώς τις καψιδικές πρωτεΐνες των νοροϊών, έχει καταστεί εφικτή η ανίχνευση των ιών αυτών με ανοσο-ενζυμικές μεθόδους (ELISA). Η μέθοδος ELISA, πραγματοποιείται κάνοντας χρήση υπερ άνοσου αντιορού και μπορεί να ανιχνεύσει τον ιό σε σχετικά χαμηλή συγκέντρωση. Η έκφραση των ιικών αντιγόνων μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί ο τίτλος των αντισωμάτων (IgG) στο

μολυσμένο δείγμα. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου, είναι ο περιορισμός των αντιγονικών τύπων που βρίσκονται μέχρι σήμερα στην διάθεση των διαγνωστικών εργαστηρίων (72).

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

2.1.1 Θετικοί μάρτυρες

Για την πραγματοποίηση των πειραματικών διαδικασιών αυτής της πτυχιακής, χρησιμοποιήθηκαν κλινικά δείγματα, ως θετικοί μάρτυρες, από επιβεβαιωμένα περιστατικά προσβολής από νοροϊό, καθώς και ένα δείγμα το οποίο είχε χαρακτηριστεί στο εργαστήριο σε προγενέστερη μελέτη.

2.1.2 Περιβαλλοντικά δείγματα

Τα περιβαλλοντικά δείγματα, λήφθηκαν από βιολογικούς καθαρισμούς του ελλαδικού χώρου.

Συλλογή και επεξεργασία λυμάτων

Πεντακόσια (500) ml από καθένα από τα δεκαπέντε δείγματα ακατέργαστων λυμάτων συλλέχτηκαν μία φορά, κάθε τρεις με τέσσερις μήνες από τον Οκτώβριο 2006 μέχρι και τον Δεκέμβριο του 2011 από εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων στην κεντρική Ελλάδα και ερευνήθηκαν στην παρούσα μελέτη [73]. Κάθε ένα από τα ακατέργαστα λύματα φυγοκεντρήθηκε στις 1000 rpm για 2 λεπτά (4 ° C) και τα υπερκείμενα εφαρμόστηκαν για μετέπειτα συγκέντρωση των ιών χρησιμοποιώντας την συμβατική μέθοδο προσρόφησης-έκλουσης φίλτρου, [17]. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στα 11000 rpm για 1 ώρα (4 ° C), το ίζημα συλλέχθηκε και διαλύθηκε σε 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος (PBS) (pH 7,4, 1X συγκέντρωση εργασίας: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ και 2 mM KH₂PO₄) και χρησιμοποιήθηκε για την RNA εκχύλιση του ιού. Ιικό RNA εκχυλίστηκε από 140 μl του υπερκειμένου χρησιμοποιώντας το QIAamp[®] ViralRNA MiniKit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Qiagen, Germany).

2.1.3 Κλινικά δείγματα

Συλλογή κλινικών δειγμάτων από κόπρανα - επεξεργασία

Δείγματα κοπράνων συλλέχθηκαν από δέκα παιδιά, με τυπικά συμπτώματα ιογενούς γαστρεντερίτιδας στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων. Τα δείγματα αραιώθηκαν σε 10 ml πλήρους ρυθμιστικού διαλύματος (PBS) (pH 7,4, 1X συγκέντρωση εργασίας: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ και 2 mM KH₂PO₄), ομογενοποιήθηκαν σε vortex και αποθηκεύτηκαν στους - 20°C. Ιικό RNA εκχυλίστηκε από 140 μl του υπερκείμενου χρησιμοποιώντας το QIAamp® ViralRNA MiniKit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Qiagen, Germany).

2.2 Εκχύλιση του ιικού RNA

Για την εκχύλιση του ιικού RNA από τα επεξεργασμένα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το QIAamp® Viral RNA MiniKit της εταιρείας Qiagen (Germany), ακολουθώντας τα προτεινόμενα συνοδευτικά πρωτόκολλα του κατασκευαστή.

Για την επιβεβαίωση μη ύπαρξης αναστολέων και της σωστής εκχύλισης εφαρμόστηκε μία επιπλέον αντίδραση PCR. Στην αντίδραση αυτή, χρησιμοποιείται ζεύγος εκκινητών που έχουν στόχο το 16S rRNA γονίδιο των βακτηρίων, τα οποία συνυπάρχουν μέσα στο εκχυλισμένο δείγμα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν οι P11P και P13P, οι οποίοι αντιστοιχούν σε αλληλουχίες κοινές για όλα τα βακτήρια.

2.3 Αντίστροφη μεταγραφή (ReverseTranscription – RT)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι νοροϊοί περιέχουν ένα θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA, γεγονός που καθιστά απαραίτητη την μετατροπή του σε συμπληρωματικό cDNA, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση PCR, η

οποία θα καταστήσει εφικτή την ενίσχυση της περιοχής του γενώματος που μας ενδιαφέρει.

Έτσι, αρχικά ετοιμάζεται το μίγμα το οποίο περιέχει: τυχαίους εκκινητές (random primers) d(N9) (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) (50nmol/μl, 1μl/tube), 10mM δεοξυτριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs, 1μl/tube, Invitrogen, UK) και απιονισμένο νερό (ddH₂O, Sigma, USA) ελεύθερο ριβονουκλεασών (5μl/tube). Σε εppendorf των 500μl προστίθεται 7μl/tube του μίγματος και 5μl του εκχυλισμένου ιικού RNA, ακολουθεί η φυγοκέντρωση και επώαση των εppendorfs στους 65°C για 5min. Μετά την επώαση, τα εppendorfs τοποθετούνται στον πάγο και ετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα το οποίο περιέχει 5X first strand Buffer (4μl/tube), 0,1M αντιοξειδωτικό διθειοθρεϊτόλη (DTT, 2μl/tube), αναστολέα ριβονουκλεασών (RNaseout, 20units/μl, 0,5μl/tube), ddH₂O και η αντίστροφη μεταγραφάση (0,5μl) (Reverse Transcriptase) M-MLV (200units/μl, Invitrogen, UK). Προστίθεται ποσότητα (8μl/tube) από το δεύτερο μίγμα και ακολουθεί φυγοκέντρωση και επώαση αυτών σε τρεις διαδοχικές συνθήκες: 25°C για 10min, 37°C για 50min και 70°C για 15min.

2.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase chain reaction – PCR)

2.4.1 Εκκινητές

Στα συμπληρωματικά cDNA τμήματα που προέκυψαν μετά την εφαρμογή της RT, εφαρμόζεται η αντίδραση PCR έτσι ώστε να ενισχυθούν. Τα εναρκτήρια ζεύγη που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Γνωρίζοντας ότι ένα σπάνιο διαγενοτυπικό ανασυνδυασμένο GII.9/GII.6 στέλεχος κυκλοφορούσε στην κεντρική Ελλάδα, από προηγούμενη μελέτη [16], θα χρησιμοποιηθεί αρχικά το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών NLVH297-NLVH896 που επέτρεψε τον εντοπισμό αυτού του ανασυνδυασμένου στελέχους για πρώτη φορά. Στη συνέχεια, για όλα τα θετικά δείγματα, ένα νέο ζεύγος εκκινητών NVLR52-NVLR871 σχεδιάστηκε από το λογισμικό Primer3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>) χρησιμοποιώντας δημοσιευμένες αλληλουχίες

νουκλεοτιδίων των GII ιικών γονιδιωμάτων, καθώς και τα στελέχη A6ORF1 και A6ORF2, αριθμοί καταχώρησης στη γονιδιακή τράπεζα GENBANK HM172493 και HM172494 αντίστοιχα που είχαν προηγουμένως χαρακτηριστεί [16] , και που καλύπτουν ένα πιο κατάλληλο μήκος του γονιδίου ORF2, για φυλογενετικούς σκοπούς, [18].

Primer	Target genogroup/genotype	ORF	Location	Ref. strain	DNA sequence (5'-3')
NLVH297	GII.9	1	4527-4546	A6ORF1 ACC.NO. HM172493	AAGCCCACTCCTGTTTTC
NLVH896	GII.6	2	5191-5162	A6ORF2 ACC.NO. HM172494	TGCCATAACCTCATTGTTGG
NVLR52	GII.9	1	4523-4541	Hu/GII.9/Alingsas/p1/2009/SWE ACC.NO.GU131223	GTCCAAGCCCACTCCTGTT
NLVR871	GII.6	2	5258-5277	Norwalk-like virus ACC.NO. AB084071	AAACAGTAAACTCGCCCTGT

Πίνακας.1. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του ανασυνδυασμένου διαγενοτυπικού νοροϊού GII.9/GII.6

2.4.2 PCR

Σε όλες τις αντιδράσεις PCR το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για την παρασκευή του μίγματος της αντίδρασης ήταν το ίδιο:

Τρία μl του προϊόντος αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν στην PCR σε ένα συνολικό όγκο 50 μl που περιείχε 10X ρυθμιστικό διάλυμα PCR (5μl/tube), 2 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs (5μl/tube), 0.5 μl Taq 5000 DNA πολυμεράση (Stratagene), (5u/μl) και 50 pmol εκκινητών (1μl/tube), (Πίνακας 1). Σε ορισμένες αντιδράσεις προστέθηκε επιπλέον MgCl₂ (50mM) ως συνπαραγοντας, έτσι ώστε να ενισχυθεί η ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης. Για κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιείται ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του μορίου στόχου, στους 95°C για 2min και ακολουθεί η εφαρμογή των διαφορετικών, για κάθε ζεύγος εκκινητών,

συνθηκών αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης. Το τελικό στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις περιλαμβάνει επώαση για 5min στους 72°C για πλήρη σύνθεση των μη ολοκληρωμένων προϊόντων PCR. Για την περαιτέρω αύξηση της ευαισθησίας της αντίδρασης, εφαρμόστηκαν δύο επιπλέον αντιδράσεις, η Autonested και η Semnested PCR. Και στις δύο περιπτώσεις, εφαρμόζεται μια απλή PCR για 25 κύκλους και στην συνέχεια το προϊόν αυτής υποβάλλεται, σε μια δεύτερη PCR. Στην πρώτη περίπτωση με τους ίδιους αρχικούς εκκινητές, ενώ στην δεύτερη περίπτωση με ένα ζεύγος εκκινητών όπου ο ένας είναι ο πρώτος εκκινητής της PCR και ο δεύτερος είναι εσωτερικός.

2.5 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

2.5.1 Καθαρισμός των προϊόντων

Τα θετικά προϊόντα της κάθε autonested ή semnested PCR, ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Ο προσδιορισμός του μήκους των επιθυμητών προϊόντων πραγματοποιείται με χρήση μάρτυρα μοριακού βάρους, 100bp DNA Ladder, ο οποίος εμφανίζει το μοριακό βάρος της κάθε ζώνης, η οποία απέχει από την γειτονική της 100bp. Οι αντίστοιχες ζώνες στα προϊόντα των autonested ή semnested PCR, απομονώνονται από το πήκτωμα και μεταφέρονται σε αποστειρωμένα tubes των 2 ml. Ακολουθεί καθαρισμός των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιώντας το QIAquick® Gel Extraction Kit (Quiagen, Germany), εφαρμόζοντας το εσωκλειστο, συνιστώμενο πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

2.5.2 Autonested GoTaq PCR

Μετά τον καθαρισμό των δειγμάτων από το πήκτωμα αγαρόζης, εφαρμόζεται η αντίδραση GoTaq PCR. Σκοπός της εφαρμογής αυτής, είναι η εκθετική ενίσχυση των

συγκεκριμένων περιοχών, χρησιμοποιώντας την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

Η αντίδραση ξεκινά με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 2min, ακολουθεί η εφαρμογή των συνθηκών αποδιάταξης στους 95°C για 1min, υβριδοποίησης για 30sec, η θερμοκρασία της οποίας εξαρτάται κάθε φορά από το ζεύγος των εκκινητών και επιμήκυνσης στους 72°C για 1min, για 20 κύκλους. Το τελικό στάδιο της αντίδρασης περιλαμβάνει την επώαση των δειγμάτων για 5min στους 72°C. Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση αυτών σε 2% συγκέντρωση αγαρόζης και ο δεύτερος καθαρισμός τους από το πήκτωμα, με χρήση του προαναφερθέντος κιτ.

2.5.3 Μοριακή κλωνοποίηση – αλληλούχιση

Η διαδικασία, έλαβε χώρα καθώς υπήρχε η υποψία για ταυτόχρονη ύπαρξη περισσότερων του ενός στελέχους νοροϊών σε αυτά. Έτσι, κάθε κλώνος μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων που προέκυψε, περιείχε κλωνοποιημένο το γενωμικό τμήμα από μόνο ένα διακριτό στέλεχος. Για την πραγματοποίηση της μοριακής κλωνοποίησης των προϊόντων της *autonested Go Taq PCR* καθώς και την οπτική επιβεβαίωση της διαδικασίας, ακολουθήθηκαν τέσσερα διαδοχικά βήματα.

A. Αντίδραση λιγάσης

Σκοπός της αντίδρασης αυτής είναι να επιτραπεί η ενσωμάτωση του ενισχυμένου, πλέον, γενωμικού τμήματος σε πλασμίδιο (φορέα κλωνοποίησης). Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι ο *pGEM®-T Easy Vector System* (Promega, USA).

Ο φορέας αυτός, περιέχει μια περιοχή πολυσυνδέτη (*polylinker*), η οποία περιέχει μία θέση ενσωμάτωσης με μονόκλωνες ουρές *poly(T)*. Τα προϊόντα της PCR, μετά την πραγματοποίηση της αντίδρασης *autonested GoTaq PCR*, απέκτησαν στα άκρα τους *poly(A)* μονόκλωνες ουρές (συμπληρωματικά άκρα). Το γεγονός αυτό, επέτρεψε στην T4 DNA λιγάση του βακτηριοφάγου, να πραγματοποιήσει την σύνδεση τους. Η συμπληρωματικότητα αυτών των άκρων, επέτρεψε στα δύο

δίκλινα μόρια DNA να ενωθούν μέσω των φωσφοδιεστερικών δεσμών που δημιουργεί η λιγάση ανάμεσα στο 3'υδροξύλιο και την διπλανή 5'φωσφορική ομάδα του DNA, οδηγώντας τελικά στην ένθεση του προϊόντος της PCR (εικ. 18).

Η πειραματική διαδικασία της αντίδρασης της λιγάσης έλαβε χώρα στους 25°C για 2h. Το μίγμα περιείχε pGEM®-T Easy Vector 50ng, προϊόν autonested GoTaq PCR, T4 DNA Ligase (3u/μl) και 2x Rapid Ligation Buffer.

B. Παραγωγή δεκτικών κυττάρων με χημική μέθοδο (χλωριούχο ασβέστιο - CaCl₂)

Για την ανάπτυξη των ανασυνδυασμένων φορέων κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά κύτταρα E.coli DH5. Το στέλεχος αυτό δεν είναι ικανό να προκαλέσει ανασυνδυασμούς και κατασταλτικές μεταλλάξεις amber. Επίσης, η φ80 lacZ ΔM15 μετάλλαξη στην αλληλουχία του γενώματός του, επιτρέπει α-συμπληρωματικότητα με το αμινοτελικό τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης (τμήμα α) που κωδικοποιείται από τον φορέα κλωνοποίησης. Το τμήμα Ω της β-γαλακτοσιδάσης κωδικοποιείται από το βακτηριακό γένωμα. Τέλος, για τον σχηματισμό ενεργού ενζύμου, απαιτείται και το τμήμα α, το οποίο κωδικοποιείται από τον φορέα, εσωτερικά του οποίου υπάρχει η περιοχή πολυσυνδέτη, που η παρουσία της δεν διαταράσσει το αναγνωστικό πλαίσιο.

Η πειραματική διαδικασία ξεκινά με την συλλογή βακτηριακών κυττάρων, τα οποία είναι αποθηκευμένα στους -80oC και τη μεταφορά τους στο αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα LB Broth (20g/L, Sigma, USA). Ακολουθεί η επώαση τους για 16h (overnight) στους 37°C στις 210 στροφές/λεπτό και στην συνέχεια μετريέται η απορρόφηση τους σε OD600, έτσι ώστε να διακοπεί η κυτταρική ανάπτυξη (τοποθέτηση σε πάγο) όταν τα κύτταρα φτάσουν στην εκθετική φάση της ανάπτυξης τους (0,450-0,550A). Στην συνέχεια, φυγοκεντρούνται στις 4000 rpm για 10min στους 4oC και απορρίπτεται το υπερκείμενο, διαλυτοποιείται το ίζημα σε παγωμένου CaCl₂ συγκέντρωσης 0,1M (Sigma, USA) και η διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά.

Γ. Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων

Η διαδικασία ενσωμάτωσης του ανασυνδυασμένου φορέα κλωνοποίησης στα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα, ξεκινά με τη μεταφορά αυτών σε αποστειρωμένα σωληνάρια. Ακολουθεί η προσθήκη του μισού ποσού της αντίδρασης της λιγάσης, του κάθε δείγματος, σε αντίστοιχο σωληνάριο και μετά από ήπια ανάδευση, τοποθετούνται στον πάγο για 30min. Στην συνέχεια, επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 42°C για 90sec και ακολούθως μεταφέρονται και πάλι στον πάγο για 2min (heat shock). Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας heat shock, μεταφέρεται ποσότητα των μετασχηματισμένων δεκτικών κυττάρων σε falcon με LB Broth και επωάζονται στους 37°C στις 180 στροφές/λεπτό για 1h. Ο σκοπός αυτής της επώασης είναι η «επούλωση» της πλασματικής μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων. Τέλος, επιστρώνεται ποσότητα από την κάθε καλλιέργεια σε τριβλίο, το οποίο περιέχει LB Agar (30g/L, Scharlau, Spain) και αμπικιλίνη (6,6mg/ml) και κατόπιν προστίθεται ποσότητα της οργανικής ενώσεως X-gal (50mg/ml, Promega, USA). Τα τριβλία επωάζονται για 16h στους 37°C.

Ο φορέας κλωνοποίησης περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, η οποία παρεμβαίνει στη σύνδεση των μονάδων πεπτιδογλυκάνης και αναστέλλει τη σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος, έτσι, αποτρέπεται η ανάπτυξη άλλων βακτηριακών κυττάρων στο τριβλίο καλλιέργειας, πέραν όσων έχουν μετασχηματιστεί με τον φορέα κλωνοποίησης. Επίσης, στα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν, όταν αυτά αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει την ουσία X-gal, η διάσπαση της από την β-γαλακτοσιδάση παράγει ένα αδιάλυτο προϊόν μπλε χρώματος.

Έτσι, όταν στον φορέα κλωνοποίησης δεν έχει εισαχθεί στην περιοχή πολυσυνδέτη το επιθυμητό ένθεμα, παράγεται το τμήμα α της β-γαλακτοσιδάσης, σχηματίζοντας το ενεργό ένζυμο και η X-gal διασπάται παράγοντας μπλε αποικίες. Στην περίπτωση που έχει γίνει ένθεση του προϊόντος PCR στην περιοχή πολυσυνδέτη, το αναγνωστικό πλαίσιο του τμήματος α της β-γαλακτοσιδάσης διαταράσσεται, με

αποτέλεσμα να μην παραχθεί το ενεργό ένζυμο και οι αποικίες να εμφανίζονται λευκές.

Η πειραματική διαδικασία συνεχίζει με την συλλογή των λευκών αποικιών, την εισαγωγή τους στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB Broth, το οποίο περιέχει αμπικιλίνη και ακολουθεί η επώαση τους για 16h στους 37°C σε 210 στροφές/λεπτό. Ακολουθεί η εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Germany), σύμφωνα με το συνοδευτικό προτεινόμενο πρωτόκολλο του κατασκευαστή, έτσι ώστε να απομονωθεί ο ανασυνδυασμένος φορέας από τις λευκές αποικίες .

Η πραγματοποίηση αυτής της αντίδρασης είναι σημαντική για την επιβεβαίωση της ένθεσης ολόκληρου του ενθέματος στον πολυσυνδέτη του φορέα κλωνοποίησης. Η πέψη γίνεται με το ένζυμο περιορισμού EcoRI (Restriction Enzyme EcoRI, Takara Biomedical group, Shiga, Japan), του οποίου θέσεις αναγνώρισης στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη.

Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ποσότητα από το εκχυλισμένο πλασμιδιακό DNA, 10x H Buffer, ένζυμο EcoRI και ddH₂O. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 2h, ενώ με το πέρας της επώασης προστέθηκαν 3μl 10x Loading Buffer έτσι ώστε να σταματήσει η αντίδραση. Η ποσότητα που προκύπτει ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

2.5.4 Εύρεση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των κλωνοποιημένων προϊόντων (αλληλούχιση)

Η αλληλούχιση των κλωνοποιημένων προϊόντων της autonested GoTaq PCR πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία MacroGen Inc. (Seoul, Korea), με εκκινητές τους επαγωγείς T7 και SP6 του φορέα κλωνοποίησης, οι οποίοι βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης.

2.5.5 Επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που κλωνοποιήθηκαν, μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα και εξελικτική τους σχέση συγκριτικά με τις αλληλουχίες προτύπων και κλινικών στελεχών των νοροϊών, οι οποίες βρίσκονται καταχωρημένες στην παγκόσμια γονιδιακή τράπεζα δεδομένων (GenBank).

Η φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών αυτών πραγματοποιήθηκε με χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής που διατίθενται δωρεάν στο διαδίκτυο.

2.5.6 Διόρθωση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης, παραλαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος πριν την επεξεργασία του οποίου, απαιτείται ο έλεγχος και η διόρθωση πιθανών λαθών. Τέτοια λάθη μπορεί να αποτελούν πιθανά κενά στην αλληλουχία, δηλαδή κορυφές του χρωματογραφήματος που δεν έχουν διαβαστεί και υπολείπονται από το κείμενο που αντιστοιχεί στην πρωτοδιάταξη της αλληλουχίας, καθώς και κάποιες κορυφές να αναγνωρίζονται ως N, δηλαδή ως πιθανή ύπαρξη στην συγκεκριμένη θέση, οποιασδήποτε από της A, T, G ή C βάσης. Στις περιπτώσεις όπου δεν είναι δυνατή η ασφαλής διόρθωση κάποιας αλληλουχίας, ζητείται η επανάληψη της αλληλούχισης (resequencing).

2.5.7 Αναζήτηση ομόλογης αλληλουχίας

Η αναζήτηση της κοντινότερης ή όμοιας αλληλουχίας πραγματοποιείται μέσα από ένα σύνολο αλληλουχιών, που βρίσκονται κατατεθειμένες στις διεθνείς τράπεζες δεδομένων (GenBank), με τη βοήθεια του προγράμματος βιοπληροφορικής BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), το οποίο διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο. Ο αλγόριθμος BLAST, αναζητά κατατεθειμένες αλληλουχίες ή τμήματα αυτών, στη GenBank, οι οποίες παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με την υπό μελέτη αλληλουχία. Η ποιότητα κάθε στοίχισης ποσοτικοποιείται σε μία κλίμακα και οι τοπικές στοίχισεις με την υψηλότερη βαθμολογία συσχέτισης (HSPs – high scoring segment pairs) καταγράφονται σε μορφή πίνακα. Ο πίνακας αυτός, παρουσιάζει τελικά τις

πιο «συγγενικές» αλληλουχίες, κατά σειρά μειωμένης βαθμολογίας συσχέτισης κατά συνέπεια και ομολογίας.

2.5.8 Ομοπαράθεση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών

Το πρώτο βήμα στην ανάλυση των αλληλουχιών και την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων είναι η στοίχιση των υπό μελέτη γενωμικών τμημάτων. Στη παρούσα εργασία η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ClustalW, το οποίο διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το ClustalW χρησιμοποιήθηκαν για την φυλογενετική μελέτη, η οποία απαιτεί τοπολογική ομολογία. Αυτό σημαίνει, ότι τα νουκλεοτίδια που παρατηρούνται σε μία συγκεκριμένη θέση στις διάφορες ταξινομικές βαθμίδες «κατάγονται» από μία συγκεκριμένη θέση ενός κοινού προγόνου. Όταν λοιπόν, δύο ή περισσότερες, υποθετικά ομόλογες αλληλουχίες έχουν διαφορετικό μήκος, τότε η τοποθέτηση των κενών επιτρέπει την ανάκτηση αυτής της τοπολογικής ομολογίας. Επίσης, με το πρόγραμμα ClustalW πραγματοποιήθηκαν οι στοιχίσεις των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των νοροϊκών στελεχών των περιβαλλοντικών μη επεξεργασμένων δειγμάτων που μελετήθηκαν, με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των στελεχών με τα οποία εμφανίζουν την υψηλότερη ομοιότητα αλληλουχίας το καθένα, καθώς επίσης και με των προτύπων στελεχών Norwalk (AF093797.1) όταν αναμένεται το στέλεχος να ανήκει στην γενετική ομάδα GI και Lordsdale (X86557.1) όταν αναμένεται να ανήκει στην γενετική ομάδα GII. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GeneRunner V. 3.05 για την ανάκτηση των αμινοξικών αλληλουχιών από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των στελεχών των δειγμάτων που μελετήθηκαν.

2.5.9 Κατασκευή φυλογενετικών δένδρων

Η κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων έλαβε χώρα με τη μέθοδο Ένωσης Γειτόνων (NeighborJoining - NJ) χρησιμοποιώντας την παράμετρο p-distance. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τη κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων

ήταν το MEGA 4. Η μέθοδος NeighborJoining είναι μία μέθοδος πολλαπλής στοίχισης αλληλουχιών με ταυτόχρονη μετατροπή της διαφοροποίησης αυτών, όπως για παράδειγμα του ποσοστού των καταλοίπων που διαφέρουν μεταξύ των δύο αλληλουχιών, σε εξελικτική απόσταση. Η στοίχιση πραγματοποιείται προοδευτικά (Progressive Alignment). Αρχικά στοιχίζονται οι δύο πιο συγγενικές αλληλουχίες, ενώ εν συνεχεία, για την προσθήκη των επόμενων αλληλουχιών, οι δύο πρώτες αλληλουχίες αντιμετωπίζονται ως μία. Μετά τη στοίχιση της επόμενης συγγενικής αλληλουχίας, οι τρεις πρώτες αλληλουχίες αντιμετωπίζονται ως μία και ούτω καθεξής. Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου NJ είναι ότι δεν χρησιμοποιεί κάποιο υποθετικό μοριακό ρολόι, με αποτέλεσμα να αποδίδει πιο σωστά την φυλογένεση, όταν διαφορετικές γενιές (lineages) παρουσιάζουν ετερογένεια ως προς τον εξελικτικό τους ρυθμό. Τέλος, η παράμετρος p -distance ή observed distance (παρατηρούμενη απόσταση), εκφράζει την αναλογία των διαφορετικών ομόλογων θέσεων μεταξύ των διαφορετικών αλληλουχιών και εκφράζεται ως ο αριθμός των νουκλεοτιδικών διαφορών ανά θέση. Στηρίζεται στη βασική αρχή της απλούστερης προσέγγισης για τον υπολογισμό της απόκλισης μεταξύ δύο κλώνων στοιχισμένων DNA αλληλουχιών, η οποία είναι η μέτρηση των θέσεων όπου αυτοί διαφέρουν.

3. Αποτελέσματα

Δεκατέσσερα από τα δεκαπέντε δείγματα του περιβάλλοντος και οκτώ από τα δέκα κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν θετικά για NoVs, με τα δύο ζεύγη εκκινητών ,επιβεβαιώνοντας ότι το ανασυνδυασμένο διαγενοτυπικό GII.9/GII.6 στέλεχος, που είχε αρχικά αναφερθεί στο Α6 κλινικό δείγμα του 2011, κυκλοφορούσε στον πληθυσμό της Κεντρικής Ελλάδας το χρονικό διάστημα 2006-2011 (Πίνακας 2). Σε κάθε δείγμα ενισχύθηκε ένα μοναδικό θραύσμα PCR μεταξύ του γονιδίου της RNA πολυμεράσης και του γονιδίου του καψιδίου, που καλύπτει το ευρύ σημείο ανασυνδυασμού της συνένωσης ORF1/ORF2 , δεδομένου ότι αυτά τα θραύσματα PCR καλύπτουν τα νουκλεοτίδια από τις θέσεις 4527 έως 5162 και από 4523 έως 5279, (ζεύγη εκκινητών NLVH297 - NLVH896 και NLVR52 - NLVR871 αντίστοιχα). Τέσσερις ανεξάρτητες δοκιμασίες PCR διεξήχθησαν για κάθε επιμέρους δείγμα και τα αμπλικόνια από τις τέσσερις διακριτές ανιχνεύσεις PCR υποβλήθηκαν σε κλωνοποίηση. Τρεις κλώνοι από κάθε επιμέρους αμπλικόνιο επιλέχθηκαν και προσδιορίστηκε η αλληλουχία αμφίδρομα. Τα αποτελέσματα της αλληλουχίας αποκάλυψαν ότι οι τρεις κλώνοι από κάθε αμπλικόνιο ήταν NoVs με ομοιότητα νουκλεοτιδίων που κυμαίνεται από 98-100%, και φέρει το ανασυνδυασμένο διαγενοτυπικό GII.9/GII.6 στέλεχος. Η αλληλουχία ενός κλώνου από το κάθε αμπλικόνιο που δημιουργήθηκε με τους εκκινητές NLVR52 - NLVR871 και υποβλήθηκε στη GenBank, (Πίνακας 2).

Περιβαλλοντικά δείγματα	Accession no.	Κλινικά δείγματα	Accession no.
EIS5	KC212141	KR2	KC212149
EX11	KC212142	KR3	KC212150
EX14	KC212143	N3	KC212151
EIS6	KC212144	A2	KC212152
LR6F	KC212145	A10	KC212153
AB9	KC212146	KR1	KC212157
AB19	KC212147	KR4	KC212158
AB7	KC212148	N2	KC212159
EIS1	KC212154		
LR12	KC212155		
EIS2	KC212156		
R1_LUG	KC662398		
R2_LUG	KC662399		
R3_LUG	KC6624400		

Πίνακας 2. Οι αριθμοί καταχώρησης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των περιβαλλοντικών και κλινικών στελεχών που ανιχνεύθηκαν στη παρούσα μελέτη.

Η φυλογενετική ανάλυση

Ερευνήθηκε η φυλογενετική σχέση των δεκατεσσάρων δειγμάτων του περιβάλλοντος με τα οκτώ κλινικά δείγματα στην παρούσα μελέτη, με άλλες αλληλουχίες νοροϊών που διατίθενται από την GenBank. Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μερικό μήκος των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του ORF1 (4523 - 5061bp) και ORF2 (5042 - 5279bp) της παρούσας

μελέτης, με την αλληλουχία στελεχών νοροϊών, διαθέσιμων από τη βάση δεδομένων Genbank. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν, σύμφωνα με BLAST ομαδοποίηση, εν μέρει οι αλληλουχίες στελεχών νοροϊών που ήταν γενετικά κοντά στην αλληλουχία των στελεχών της παρούσας μελέτης. Η αρχική φυλογενετική ανάλυσή έδειξε ότι η ORF1 ακολουθία στα κλινικά στελέχη: KR1, KR2, KR3, KR4, N2, N3, A2, A10, A6 και στα περιβαλλοντικά στελέχη: AB7, AB9, LR6F, EIS6, AB19, EX14, EX11, EIS5, EIS1, ΔΚΣ2, LR12, R1_LUG, R2_LUG, R3_LUG σχημάτιζε σύμπλεγμα με στελέχη GII.9, ενώ τα ίδια στελέχη σε ORF2 ακολουθία, διακλαδισμένα έξω από το παραπάνω σύμπλεγμα, σχημάτιζαν σύμπλεγμα με GII.6 στελέχη.

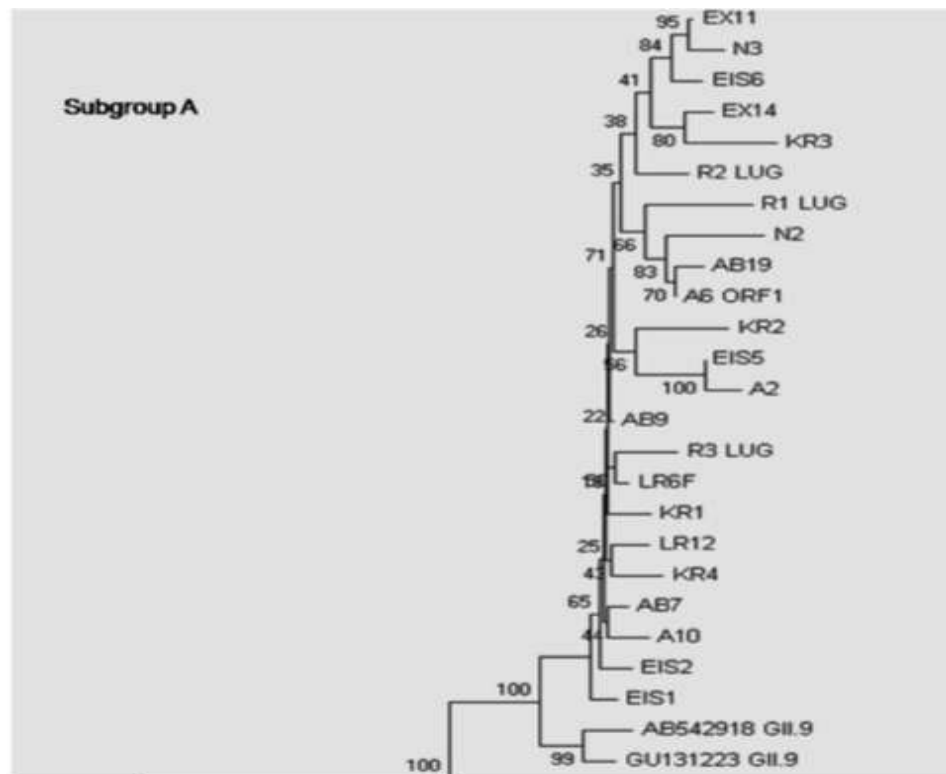
ORF1

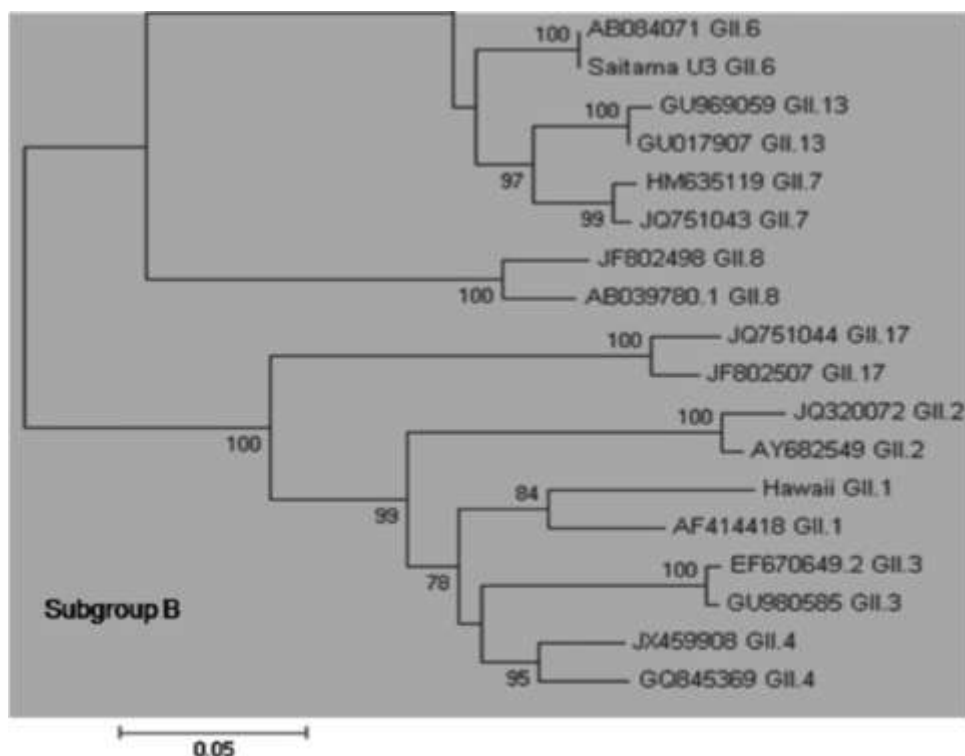
Το φυλογενετικό δέντρο τμήματος του γονιδίου ORF1 κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας την neighborjoining μέθοδο που βασίζεται σε τμήμα της περιοχής RdRp , που αντιστοιχεί στην νουκλεοτιδική αλληλουχία στις θέσεις 4527-5042. Η ανάλυση αποκάλυψε δύο διαφορετικές φυλογενετικές ομάδες (υποομάδα A και B), με την μέθοδο bootstrap, (1000 Bootstrap), (Εικ. 7 και Εικ. 8). Η υποομάδα A (Εικ. 6), περιείχε όλα τα περιβαλλοντικά και κλινικά στελέχη , τα οποία ταξινομήθηκαν με το γονότυπο GII.9.

Η υποομάδα B (Εικ. 8), αποτελείται από τα στελέχη, GIFU'99,SaitamaU3,Hu/GII.13/8686/Maizuru/2008/JPN,Hu/GII.13/8594/Maizuru/2008/JPN,Hu/GII.7/Seoul/0342/2008/KOR,Hu/GII.7/Wuhan/E2124/CHN/2010, Hu/GII.8/A155/Limbe/2009/Cameroon,SaitamaU25,Hu/GII.17/Wuhan/Z776/CHN/2007,Hu/GII.17/C15b/Bonaberi/Cameroon,Hu/GII.2/NF2002/USA/2002,Xou/NLV/Pont deRoide673/2004/Francethat,Hu/GII.4/Sydney/NSW0514/2012/AU,Hu/GII.4/Armida le/NSW390I/2008/AU,Hu/GII.1/7EK/Hawaii/1971/USA,NLV/Westover/302/1994/US, Hu/Hebei/48580/2006/CHN και Hu/GII.3/CBNU1/2006/KOR που κατατέθηκαν στο GenBank υπό τους αριθμούς AB084071 , AB039776 , GU969059 , GU017907 , HM635119 , JQ751043 , JF802498 , AB039780 , JQ751044 , JF802507, JQ320072 , AY682549 , JX459908, GQ845369 , JX289822 , AF414418 , EF670649 και GU980585 αντίστοιχα , που ήταν στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους , αλλά σχημάτιζαν ένα σημαντικό αριθμό κλάδων και μονά κλαδιά. Μέσα στην υποομάδα A, όλα τα κλινικά

στελέχη: KR1, KR2, KR3, KR4, N2, N3, A2, A10, A6 και τα περιβαλλοντικά στελέχη: AB7, AB9, LR6F, EIS6, AB19, EX14, EX11, EIS5, EIS1, LR12, ΔΚΣ2, R1_LUG, R2_LUG, R3_LUG ήταν πιο στενά συνδεδεμένα με τα στελέχη: Hu/OH07011/2007/JP με ταυτοποίηση νουκλεοτιδίων 91-96% και Hu/GII.9/Alingsas/p1/2009/SWE με ταυτοποίηση νουκλεοτιδίων 93-96%.

Εικόνα 7. Φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε με βάση μερικές ακολουθίες του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης ORF2 του NoV. Η ανάλυση διεξήχθη χρησιμοποιώντας MegAlign, έκδοση 5.1 (beta3). Η απόσταση υπολογίζεται με τη μέθοδο neighbor-joining. Οι αριθμοί σε κάθε κλάδο δείχνουν τις τιμές bootstrap για τις συστοιχίες που υποστηρίζονται από το εν λόγω κλάδο. Subgroup A.





Εικόνα 8. . Φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε με βάση μερικές ακολουθίες του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης ORF2 του NoV. Η ανάλυση διεξήχθη χρησιμοποιώντας MegAlign, έκδοση 5.1 (beta3). Η απόσταση υπολογίζεται με τη μέθοδο neighbor-joining. Οι αριθμοί σε κάθε κλάδο δείχνουν τις τιμές bootstrap για τις συστοιχίες που υποστηρίζονται από το εν λόγω κλάδο. Subgroup B.

ORF2

Η φυλογενετική ανάλυση τμήματος του γονιδίου ORF2 επίσης κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο neighborjoining, (1000 Bootstrap) η οποία βασίζεται σε αλληλουχίες του καψιδίου διαθέσιμες από την GenBank, (Εικ.7 και Εικ.8). Το ORF2 φυλογενετικό δέντρο κατασκευάστηκε με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των στελεχών που ήταν γενετικά κοντά στα περιβαλλοντικά και κλινικά στελέχη, συν δεκαοκτώ άλλα GII NoVs. Από το φυλογενετικό δένδρο που παρουσιάζεται στις εικόνες 7 και 8, συνεπάγεται ότι τα στελέχη ήταν γενετικά κοντά σε : Norwalk - όπως ο ιός - GIFU'99 με ταυτοποίηση νουκλεοτιδίων 95-97 % , και Saitama U3 με ταυτοποίηση νουκλεοτιδίων 93-97 %. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα στελέχη Hu/OH07011/2007/JP και Hu/GII.9/Alingsas/p1/2009/SWE τα οποία ήταν πιο στενά

συνδεδεμένα με τα περιβαλλοντικά και κλινικά στελέχη του ORF1 με βάση τη φυλογένεση, ανήκαν στον GII.9 γονότυπο σχετικά με το γονίδιο ORF2. Από την άλλη πλευρά, όπως παρουσιάζεται στις εικόνες 7 και 8, στελέχη (Norwalk - όπως ο ιός - GIFU'99 και SaitamaU3), τα οποία ήταν πιο στενά συνδεδεμένα με τα στελέχη των φυλογενέσεων με βάση το γονίδιο ORF2, ανήκαν στο γονότυπο GII.6 σχετικά με το γονίδιο ORF1. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι και οι δύο ομάδες των περιβαλλοντικών και κλινικών στελεχών ήταν διαγενετοτυπικοί ανασυνδυασμοί εντός της GII genogroup μεταξύ GII.9 και GII.6.

Συμβάν ανασυνδυασμού

Σε μια προσπάθεια να εντοπιστούν τα πιθανά στελέχη και οι πιθανές θέσεις ανασυνδυασμού, διεξήχθη φυλογενετική ανάλυση χρησιμοποιώντας το Simplot πρόγραμμα. Δεδομένου ότι τα περιβαλλοντικά και κλινικά στελέχη μοιράζονται 97-99% ομοιότητα νουκλεοτιδίων, χρησιμοποιήσαμε ένα από κάθε ομάδα, EIS5 από την περιβαλλοντική ομάδα και A10 από την κλινική ομάδα. Μια περιοχή ομοιότητας για τα στελέχη EIS5 και A10 δημιουργήθηκε με τα στελέχη Hu/OH07011/2007/JP και Hu/GII.9/Alingsas/p1/2009/SWE, αριθμοί πρόσβασης AB542918 και GU131223 αντίστοιχα, καθώς και με την ένταξη των GIFU'99 και SaitamaU3, με αριθμούς καταχώρησης AB084071 και AB039776 αντίστοιχα. Ένα διαχωριστικό σημείο ανασυνδυασμού στη νουκλεοτιδική θέση 5023 της αλληλουχίας ήταν εμφανής μεταξύ των δύο διαφορετικών γονότυπων εντός του ίδιου genogroup.

4. Συζήτηση

Οι NoVs είναι η πιο κοινή αιτία μη βακτηριακής οξείας γαστρεντερίτιδας, προκαλώντας πολυάριθμα κρούσματα σε όλο τον κόσμο, (1). Το γονιδίωμα των NoV υποβάλλεται σε συνεχείς αλλαγές μέσω μεταλλάξεων και ανασυνδυασμών. Υψηλά ποσοστά αντικαταστάσεων νουκλεοτιδίων, οφείλονται στους σύντομους χρόνους αντιγραφής και στην έλλειψη διορθωτικής δραστηριότητα της RdRp, με αποτέλεσμα να παράγονται συνεχώς μεταλλαγμένα γονιδιώματα,, (75). Ο ανασυνδυασμός μεταξύ των γονιδιωμάτων συμβαίνει συχνά και είναι ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό της εξέλιξης των NoVs, (75). Ο ανασυνδυασμός μπορεί να επηρεάσει τη μολυσματικότητα, καθώς επίσης αποτελεί και έναν ουσιαστικό μηχανισμό συντήρησης του ιού στον πληθυσμό. Η εξάπλωση και η εμφάνιση των ανασυνδυασμένων NoVs σε συμπτωματικά άτομα, επιβεβαιώνει τη μολυσματικότητα τους σε ανθρώπους-ξενιστές και δείχνει ότι ο ανασυνδυασμός δεν εμποδίζει τη λοιμογόνο δύναμη του ιού, (21).

Μοριακές επιδημιολογικές μελέτες παρέχουν πληροφορίες ζωτικής σημασίας σχετικά με τα κυκλοφορούντα στελέχη σε οποιαδήποτε περιοχή για την εμφάνιση νέων ανασυνδυασμένων στελεχών, (76,77). Σύμφωνα με τα στοιχεία του σχεδίου της ισχύουσας Ευρωπαϊκής επιτήρησης "Food-borne Viruses in Europe", (22) μια αναδυόμενη ομάδα φυσικών ανασυνδυασμένων στελεχών νοροϊών εμφανίστηκε στην Ευρώπη και προκάλεσε διηπειρωτικές λοιμώξεις, οι οποίες πιστεύεται ότι συνδέονται με την εξαπλώσή τους μέσω του νερού και των τροφίμων, (25). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ένα νέο ανασυνδυασμένο στέλεχος που εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 2000 στη Γαλλία, μετέπειτα έγινε κυρίαρχο, με κρούσματα και σποραδικά περιστατικά στην Ισπανία, στη Σουηδία και στη Ουγγαρία, (25). Η εμφάνιση νέων παραλλαγών είναι ανάλογη με ό, τι παρατηρείται στη γρίπη, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ανοσία του πληθυσμού μπορεί να οδηγεί την εξέλιξη των ιών, (78) . Οι αντιγονικές παραλλαγές που συναντώνται στον τομέα P2 πιστεύεται ότι μπορούν να επιτρέψουν την αποφυγή ανοσίας στους NoVs στον πληθυσμό, (6) . Υπάρχουν δύο αναγνωρισμένοι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην

αντοχή λοίμωξης από νοροϊούς: οι γενετικοί παράγοντες και η επίκτητη ανοσία. Ο πιθανός ρόλος της γενετικής αντίστασης αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά όταν οι πειραματικές μελέτες με τον ιό Norwalk έδειξαν ότι οι συμμετέχοντες ήταν επανειλημμένα ευαίσθητοι ή ανθεκτικοί στη συμπτωματική λοίμωξη μετά από επαναλαμβανόμενη χορήγηση ιού, (24). Ακολούθως, VLPs από ιό Norwalk αποδείχθηκε να συνδέονται διαφορετικά με αντιγόνα ομάδας (HBGAs), και το δεσμευτικό μοτίβο να συσχετίζεται με την ευαισθησία στη μόλυνση και στην ασθένεια, (25,26). Έτσι, είναι πιθανό ότι κάθε άτομο είναι γενετικά ευπαθές σε έναν ή περισσότερους γονότυπους. Κάθε ένα από τα τρία είδη σακχάρων των HBGAs, οι A / B, H και Lewis επίτοποι, αντιπροσωπεύουν μια τέτοια επιλογή σε κάθε έναν από τους δύο σημαντικούς ανθρώπινους γονότυπους NoV, GI και GII. Οι ABO είναι οι πιο κοινοί τύποι αίματος, που αντιπροσωπεύουν το 80% του ευρωπαϊκού και βορειοαμερικανικού πληθυσμού, (27).

Όμως, αυτή η μελέτη εξηγεί μερικές σημαντικές πτυχές των NoVs, όπως την επιδημιολογία, τη ταξινόμηση και τον έλεγχο των ασθενειών. Για την περεταίρω κατανόηση της αλληλεπίδρασης NoVs -ξενιστή και τα κλινικά αποτελέσματα τους, απαιτείται περισσότερη έρευνα στο μέλλον σχετικά με τη δομή των HBGA που σχετίζονται με NoVs γονότυπους και ιδίως με NoVs που βρέθηκαν να έχουν ανασυνδυασμό στην ORF1/ORF2 γονιδιωματική περιοχή, και στη συνέχεια να συγκριθούν με άλλους υποδοχείς ή συν-υποδοχείς που εντοπίστηκαν και χαρακτηρίστηκαν πως θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ευαισθησία του ξενιστή. Επίσης, κι άλλοι παράγοντες, όπως η ανοσία του ξενιστή, θα μπορούσε να επηρεάσει την εξέλιξη και την επιδημιολογία NoV.

Η ιογενής γαστρεντερίτιδα είναι πλέον καλά τεκμηριωμένη στις περισσότερες από τις βιομηχανικές χώρες, σε αντίθεση με την Ελλάδα, όπου τα επιδημιολογικά δεδομένα σχετικά με NoVs εξακολουθούν να λείπουν. Μέχρι πρόσφατα, έχουν υπάρξει μόνο δύο επιδημιολογικές μελέτες στη βορειοανατολική Ελλάδα για το έτος 2006, (30,31), οι οποίες αναφέρονται σε μια έξαρση η οποία αποδίδεται σε μολυσμένο πόσιμο νερό, (30).

Στην παρούσα μελέτη, περιγράφεται ο μοριακός χαρακτηρισμός των ανασυνδυασμένων Νοροϊών GII.9/GII.6 που σχετίζονται με γαστρεντερίτιδα σε κλινικά δείγματα και συγχρόνως ότι τα στελέχη αυτά εντοπίστηκαν σε ακατέργαστα λύματα κατά την ίδια χρονική περίοδο. Η ανάλυση αλληλουχίας από τα οκτώ κλινικά και δεκατέσσερα περιβαλλοντικά ανασυνδυασμένα στελέχη, τα οποία ανιχνεύθηκαν στην παρούσα μελέτη, αποκάλυψε ένα φυσικό διαγενοτυπικό ανασυνδυασμό μεταξύ NoV GII στελεχών. Το σημείο ανασυνδυασμού εντοπίστηκε στην επικαλυπτόμενη περιοχή του ORF1/ORF2 (GII.9/GII.6 αντίστοιχα) και προσδιορίστηκε με Simplot στη νουκλεοτιδική θέση 5032bp, (Εικ.3). Η ανακάλυψη αυτού του νέου ανασυνδυασμού, GII.9/GII.6 είναι άλλο ένα παράδειγμα της τεράστιας ποικιλομορφίας μεταξύ των Νοροϊκών στελεχών, και μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις για τις μελλοντικές στρατηγικές του εμβολίου.

Εν κατακλείδι, δεδομένης της σημασίας των NoVs ως αιτία επιδημικών γαστρεντερίτιδων, η περιβαλλοντική παρακολούθηση των Νοροϊών θα μπορούσε να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο που θα απεικονίζει την κυκλοφορία και τη επιδημιολογία των ιών αυτών. Εντατικότερη επιτήρηση και περαιτέρω διερεύνηση των NoVs θα μπορούσε να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την μετάδοση και τη παθογένεια των ιών αυτών καθώς και την εξέλιξη και εξάπλωση των ιών αυτών σε ένα δεδομένο πληθυσμό.

Βιβλιογραφία

1. Mead PS, Slutsker L, Griffin PM, Tauxe RV. Food - related illness and death in the United States. Reply to Dr. Hedberg. *Emerg Infect Dis* (1999); 5: 841–842.
2. Atmar RL, Estes MK. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterol Clin North Am* (2006); 35: 275–290, viii.
3. Rockx B, et al. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* (2002);35:246–253.
4. Dolin R., Blacklow N.R., DuPont H., et al. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* (1972); 140: 578-583.
5. Almeida J.D., Waterson A.P. The morphology of virus-antibody interaction. *Adv Virus Res* (1969); 15: 307-338.
6. Thornhill T.S., Wyatt R.G., Kalica A.R., et al. Detection by immune electron microscopy of 26- to 27-nm virus-like particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. *J Infect Dis* (1977); 135: 20-27.
7. . Dolin R., Reichman R.C., Roessner K.D., et al. Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. *J Infect Dis* (1982); 146: 184-189.
8. Caul E.O. and Appleton H. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification. *J Med Virol* (1982);9:257-65.
9. Jiang X., Wang M., Wang K., et al. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* (1993); 195: 51-61.
10. Lambden P.R., Caul O., Ashley C., et al. Sequence and genome organization of a human small round structured (Norwalk-like) virus. *Science* (1993);259:516-519.

11. Liu B.L., Lambden P.R., Gunther H., et al. Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* (1999);73 :819-825.
12. Karst S.M., Wobus C.E., Lay M., et al. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* (2003); 299:1575-1578.
13. Parashar UD, Monroe SS "Norwalk-like viruses" as a cause of foodborne disease outbreaks". *Rev. Med. Virol.* 11 (4) (2001).: 243-52. doi:10.1002/rmv.321. PMID 11479930
14. Jiang, X. et al. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science*(1990) 250, 1580–1583
15. Prasad, B.V. et al. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* (1999) 286, 287–290
16. Glass, P.J. et al. The Norwalk virus ORF 3 encodes a minor structural protein. *J. Virol.* (2000) 74, 6581–6591
17. Green, K.Y. et al. Human calciviruses. In *Fields Virology* (Vol. 1) (Knipe, D.M. et al., eds), (2001) pp. 841–874, Lippincott, Williams & Wilkins
18. Vinje, J. et al. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of “Norwalk-like viruses”. *Arch. Virol.* (2000) 145, 223–241
19. Oliver, S.L. et al. Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *J. Virol.* (2003) 77, 2789–2798
20. Deng, Y. et al. Studies of epidemiology and seroprevalence of bovine noroviruses in Germany. *J. Clin. Microbiol.* (2003) 41, 2300–2305
21. Smiley, J.R. et al. Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses. *J. Clin. Microbiol.* (2003) 41, 3089–3099

22. Fankhauser, R.L. et al. Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like Viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis.* (2002) 186, 1–7
23. Zheng D.P., Ando T., Fankhauser R.L., et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* (2006);346:312-323.
24. Caul EO. Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *Lancet* (1994);343:1240–1242.
25. Duizer, E., K. J. Schwab, F. H. Neill, R. L. Atmar, M. P. Koopmans, and M. K. Estes. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J. Gen. Virol.* (2004) 85:79-87.
26. Green, K. Y., R. M. Chanock, and A. Z. Kapikian. Human Caliciviruses, .(2001) p. 841-874. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
27. Xi JN, Graham DY, Wang KN, Estes MK. NV genome cloning and characterization. *Science* (1990);250:1580–1583.
28. Baric RS, et al. Expression and self-assembly of NV capsid protein from Venezuelan equine encephalitis virus replicons. *J Virol* (2002);76:3023–3030.
29. Green KY, Lew JF, Jiang X, Kapikian AZ, Estes MK. Comparison of the reactivities of baculovirus-expressed recombinant NV capsid antigen with those of the native NV antigen in serologic assays and some epidemiologic observations. *J Clin Microbiol* (1993);31:2185–2191. Baric RS, et al. Expression and self-assembly of NV capsid protein from Venezuelan equine encephalitis virus replicons. *J Virol* (2002);76:3023–3030.
30. Jiang X, Wang M, Graham D, Estes M. Expression, self-assembly and antigenicity of the NV capsid protein. *J Virol* (1992);66:6527–6532.
31. Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. X-ray crystallographic structure of the NV capsid. *Science* (1999);286:287–290.

32. Prasad BV, Rothnagel R, Jiang X, Estes MK. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed NV capsids. *J Virol* (1994);68: 5117–5125.
33. Venkataram Prasad BV, Hardy ME, Estes MK. Structural studies of recombinant Norwalk capsids. *J Infect Dis* (2000);181 (Suppl.):S317–S321.
34. Tan M, Huang P, Meller J, Zhong W, Farkas T, Jiang X. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histoblood group antigens: evidence for a binding pocket. *J Virol* (2003);77:12562–12571.
35. Cao S, et al. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol* (2007);81:5947–5957.
36. Asanaka M, Atmar RL, Ruvolo V, Crawford SE, Neill FH, Estes MK. Replication and packaging of NV RNA in cultured mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (2005);102:10327–10332.
37. Neill J.D. The subgenomic RNA of feline calicivirus is packaged into viral particles during infection. *Virus Res* (2002);87:89-93.
38. Kapikian AZ. The discovery of the 27-nm NV: an historic perspective. *J Infect Dis* (2000);181 (Suppl):S295–S302.
39. . Kapikian ZZ, Estes MK, Chanock RM. Norwalk Group of Viruses. Philadelphia: Lippincott-Raven, (1996)
40. (22) Seah EL, Marshall JA, Wright PJ. Trans activity of the norovirus Camberwell proteinase and cleavage of the N-terminal protein encoded by ORF1. *J Virol* (2003);77:7150–7155.
41. Ettayebi K, Hardy ME. NV nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J Virol* (2003);77:11790–11797.
42. Fernandez-Vega V, et al. NV N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells. *J Virol* (2004);78:4827–4837.

43. Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JW, Hardy ME. The genome-linked protein VPg of the NV binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J* (2003);22:2852–2859.
44. Daughenbaugh KF, Wobus CE, Hardy ME. VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Virology* (2006);3:33.
45. Rohayem J, Robel I, Jager K, Scheffler U, Rudolph W. Protein-primed and de novo initiation of RNA synthesis by norovirus 3Dpol. *J Virol* (2006);80:7060–7069.
46. Rohayem J, Jager K, Robel I, Scheffler U, Temme A, Rudolph W. Characterization of norovirus 3Dpol RNA-dependent RNA polymerase activity and initiation of RNA synthesis. *J Gen Virol* (2006);87:2621–2630.
47. Blakeney SJ, Cahill A, Reilly PA. Processing of NV nonstructural proteins by a 3C-like cysteine proteinase. *Virology* (2003);308:216–224.
48. Liu B, Clarke IN, Lambden PR. Polyprotein processing in Southampton virus: identification of 3C-like protease cleavage sites by in vitro mutagenesis. *J Virol* (1996);70:2605–2610.
49. Liu BL, Lambden PR, Gunther H, Otto P, Elschner M, Clarke IN. Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* (1999);73:819–825.
50. Seah EL, Marshall JA, Wright PJ. Open reading frame 1 of the Norwalk-like virus Camberwell: completion of sequence and expression in mammalian cells. *J Virol* (1999);73:10531–10535.
51. Sosnovtsev SV, et al. Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J Virol* (2006);80:7816–7831.
52. Nakamura K, et al. A norovirus protease structure provides insights into active and substrate binding site integrity. *J Virol* (2005);79:13685–13693.
53. Someya Y, Takeda N, Miyamura T. Identification of active-site amino acid residues in the Chiba virus 3C-like protease. *J Virol* (2002);76:5949–5958.

54. Ward JM, et al. Pathology of immunodeficient mice with naturally occurring murine norovirus infection. *Toxicol Pathol* (2006);34:708–715.
55. Zeitler CE, Estes MK, Venkataram Prasad BV. X-ray crystallographic structure of the NV protease at 1.5-Å resolution. *J Virol* (2006);80:5050–5058.
56. . Fukushi S, et al. Poly(A)- and primer-independent RNA polymerase of Norovirus. *J Virol* (2004);78:3889–3896.
57. Cooper PD, Steiner-Pryor A, Scotti PD, Delong D. On the nature of poliovirus genetic recombinants. *J Gen Virol.* (1974);23:41–9.
58. Miller WA, Koev G. Minireview: synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology.* (2000);273:1–8.
59. . Miller WA, Dreher TW, Hall TC. Synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA in vitro by internal initiation on (–) sense genomic RNA. *Nature.* (1985);313:68–70.
60. Ishikawa M, Janda M, Krol MA, Ahlquist P. In vivo DNA expression of functional brome mosaic virus RNA replicons in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol.* (1997);71:7781–90.
61. Haseltine WA, Kleid DG, Panet A, Rothenberg E, Baltimore D. Ordered transcription of RNA tumor virus genomes. *J Mol Biol.* (1976);106:109–31.
62. van Marle G, Dobbe JC, Gultyaev AP, Luytjes W, Spaan WJ, Snijder EJ. Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense and antisense transcription-regulation sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1999);96:12056–61.
63. Marionneau S., Ruvoen N., Le Moullac-Vaidye B., et al. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* (2002);122:1967–1977.
64. Kaplan JE, Schonberger LB, Varano G, Jackman N, Bied J, Gary GW. An outbreak of acute nonbacterial gastroenteritis in a nursing home. Demonstration of person-

toperson transmission by temporal clustering of cases. *Am J Epidemiol* (1982);116:940–948.

65. Parashar UD, Monroe SS “Norwalk -like viruses” as a cause of foodborne disease outbreaks. *Rev Med Virol* (2001);11:243–252.

66. Crane J.K., Guerrant R.L. *Acute Watery Diarrhea*. New York: Raven Press; (1995).

67. Barker J., Vipond I.B., Bloomfield S.F. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of norovirus contamination via environmental surfaces. *J Hosp Infect* 2004;58:42-122. Outbreaks of Norwalk-like viral gastroenteritis - Alaska and Wisconsin, (1999). *Morbidity and Mortality Weekly Report* (2000);49:207-211.

68. . Estes M.K., Ball J.M., Guerrero R.A.. Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *J Infect Dis* (2000);181:S367-373

69. Treanor JJ, Dolin R. Norwalk Virus and Other Caliciviruses. In: Mandell GL, Bennett JE, 5th Edition ed. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Vol. 2. Philadelphia: Churchill Livingstone; (2000). 1949-1956.

70. Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clinical Microbiology Reviews* (2001);14:15-37.

71. CDC Norovirus Activity- United States 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report* (2003);52:41-45.

72. Parashar UD, Quiroz ES, Mounts AW, et al. “Norwalk-like viruses:” Public health consequences and outbreak management. *Morbidity and Mortality Weekly Report* (2001);50: 1-17.

73. Bertolotti - Ciarlet, A. et al. Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J. Virol.* (2002) 76, 4044–4055

74. Gordon I., Ingraham H.S., Korn R.F. Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates. *J Exp Med* (1947);86:409-422.

75. Kojima S., Fukumi H., Kusama H., et al. Studies on the causative agent of the infectious diarrhea: records of the experiments on human volunteers. *Jpn Med J* (1948); 1: 467-476.
76. Sugieda, M. and Nakajima, S. Viruses detected in the caecum contents of healthy pigs representing a new genetic cluster in genogroup II of the genus “Norwalk-like viruses”. *Virus Res.* (2002) 87, 165–172
77. Karst, S.M. et al. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* (2003) 299, 1575–1578
78. . Hale, A. et al. Distinct epidemiological patterns of Norwalk-like virus infection. *J. Med. Virol.* (2000) 62, 99–103
79. Wobus C.E., Karst S.M., Thackray L.B., et al. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biology* (2004); 2:e432.
80. Jiang X, Graham D, Wang K, Estes M. NV genome cloning and characterization. *Science* (1990); 250:1580–1583.